



Ana Rita Martins Bastos

**Caraterização dos polissacarídeos da parede
celular de leveduras**



Ana Rita Martins Bastos

Caraterização dos polissacarídeos da parede celular de leveduras

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Ramo Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor Manuel António Coimbra, Professor Associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Elisabete Coelho, Bolseira de Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais, irmão e avó por toda a confiança e amor

“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho.”

— Abraham Lincoln

O júri

Presidente	Professor Doutor José António Teixeira Lopes da Silva professor auxiliar do departamento de Química da Universidade de Aveiro
Orientador	Professor Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva professor associado com agregação do departamento de Química da Universidade de Aveiro
Coorientador	Doutora Elisabete Verde Martins Coelho Bolsista de pós- doutoramento do departamento de Química da Universidade de Aveiro
Arguente	Mestre Tiago Monteiro Brandão Diretor de Inovação e Desenvolvimento da Unicer Bebidas, SA

Agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores Professor Doutor Manuel António Coimbra e Doutora Elisabete Coelho por todo o conhecimento transmitido, disponibilidade, motivação e paciência ao longo deste ano. O vosso acreditar foi essencial para impulsionar e estimular esta etapa da minha vida.

Agradeço ao Professor Tiago Brandão pelo conhecimento e pela inspiração. À Unicer Bebidas, SA, pela levedura cervejeira *S. pastorianus* fornecida.

À Doutora Ana Catarina Gomes do Biocant pelas leveduras *S. cerevisiae*, e ao Professor Doutor Manuel Santos e Doutora Ana Rita Bezerra pelas *C. albicans*.

Ao Professor Doutor Manuel Vilanova pela disponibilidade do laboratório de Imunologia, ICBAS. Agradeço em particular ao Pedro Madureira pela preciosa ajuda na realização da citometria de fluxo.

À Paula Santos pela disponibilidade para as análises de RMN de sólidos.

Ao QOPNA e a todos os meus colegas de laboratório pelo acolhimento, boa disposição, união e “família”. Agradeço em especial à Lisete Silva, à Élia Maricato, e à Andreia Catarina porque sem elas não teria sido a mesma coisa.

Agradeço a todos os meus amigos. Aos que mesmo longe estão perto, e a todos os que esta academia me trouxe. Contudo, o meu agradecimento especial vai para a Joana Rita, para a Catarina e para a Hortinha. Pela vossa amizade verdadeira e por todos estes anos de caminhada conjunta. Que os laços que nos unem sejam eternos!

À Margarida e à Joana, por toda a força, alegria e companheirismo essenciais nesta fase final. Por acreditarem em mim a 100% até ao fim! Também a todos os meus amigos que fizeram da residência uma “casa”, à Lú, à Andreia Luís, ao Pedro, à Liliana, à Sara, à Rita, à Andreia e à Lena.

Aos meus pais, irmão e avó por serem os meus pilares, por acreditarem em mim e apoiarem as minhas escolhas.

Obrigado a todos os que caminharam comigo ao longo destes anos e me ajudaram a ser quem sou hoje. Aos que já passaram pela minha vida e aos que aparecerem por fim! Todos deixaram marca, todos estão no meu coração!

Palavras-chave

Saccharomyces pastorianus, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, polissacarídeos, glucanas, manoproteínas

Resumo

As leveduras são microrganismos eucariotas fúngicos, caracterizadas geralmente pelo seu envolvimento em fermentações (*Saccharomyces* spp.), ou pelo seu caráter patogénico (*Candida* spp.). As leveduras são constituídas por uma parede celular rígida que se revela determinante para a morfologia, integridade, sobrevivência e patogenicidade. Embora a composição da parede varie entre espécies, esta é essencialmente constituída por polissacarídeos, em particular glucanas e manoproteínas.

Neste trabalho foram analisados os polissacarídeos da parede celular da *S. pastorianus* do inóculo inicial (LIn) e excedentária do processo cervejeiro (LEx). Foi realizada uma extração sequencial dos polissacarídeos da parede celular com recurso a ultrassons, preparação do resíduo insolúvel em álcool (AIR), extração com água quente e soluções alcalinas de concentração crescente. As manoproteínas da parede foram maioritariamente solubilizadas com 4M KOH, extraíndo-se a partir do AIR 19 % para a LIn e 21 % para a LEx. Após as extrações alcalinas, o resíduo final da LIn ainda era composto por 51% de polissacarídeos por solubilizar, maioritariamente constituídos por glucose em ligação (1→3) e (1→4) nas proporções 42 % e 16 %. Em contraste, no resíduo final da LEx composto por 68% de polissacarídeos insolúveis, as proporções de glucose em ligação (1→3) e (1→4) invertem, contendo 17 % e 43 %, respetivamente. Em ambas as leveduras, a configuração anomérica da glucose em ligação (1→4) foi investigada por hidrólise com α -amilase e celulase, apresentando os resíduos ligações α e β numa proporção 2:1, respetivamente. Estes resultados mostram que com o processo cervejeiro, a *S. pastorianus* modifica os polissacarídeos da sua parede celular por incremento das glucanas em ligação (1→4) em detrimento das (1→3) glucanas. As manoproteínas do resíduo final, resistentes à extração alcalina sequencial, apresentaram atividade imunoestimuladora com um máximo de 77 % de ativação de células B para uma concentração de 17 μ g/mL.

Foram também analisados os polissacarídeos da parede celular de outras leveduras nomeadamente *S. cerevisiae* da fermentação do vinho e de *C. albicans*. A parede celular da *S. cerevisiae* apresenta elevada quantidade de glucose em ligação (1→4), até 70% para *S. cerevisiae* do vinho branco. Em contrapartida, a parede celular de *C. albicans* apresenta uma quantidade reduzida de glucose em ligação (1→4), até 5%, distinguindo-se pelo elevado teor de manoproteínas em ligação (1→2) e quitina com N-acetilglucosamina em ligação (1→4).

Concluiu-se assim que, apesar da composição polissacarídica semelhante, as leveduras *S. pastorianus*, *S. cerevisiae* e *C. albicans* apresentam uma parede celular com diferentes proporções e organização. As diferenças estruturais na parede celular das leveduras permitem a sua adaptação e sobrevivência a diferentes stresses e ambientes, bem como a presença de características únicas como a patogenicidade.

Keywords

Saccharomyces pastorianus, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, polysaccharides, glucans, mannoproteins

Abstract

Yeasts are fungal eukaryotic microorganisms commonly known for the involvement in fermentations (*Saccharomyces* spp.) or their pathogenicity (*Candida* spp.). Yeasts are constituted by a rigid cell wall, which is crucial in determining the morphological integrity, survival and pathogenicity. Although the cell wall composition varies among species, it is constituted essentially by polysaccharides, in particular glucans and mannoproteins.

In the present work, the cell wall polysaccharides of initial inoculum (LIn) and spent brewer's yeast (LEx) *S. pastorianus* were analyzed.

Firstly, it was performed a sequential extraction of cell wall polysaccharides, using ultrasounds, preparation of alcohol insoluble residue (AIR), extraction with hot water and alkaline solutions. Cell wall mannoproteins were mostly extracted with 4M KOH solution, namely 19% for LIn and 21% for LEx, from the AIRs. After alkaline extraction, the final residue of LIn still contained 51% of insoluble carbohydrates, mostly composed by (1 → 3) and (1 → 4) linked glucose with 42 % and 16 %, respectively. Otherwise, in the LEx final residue, composed by 68% of insoluble polysaccharides, the proportions of (1 → 3) and (1 → 4) linked glucose reverses, with 17 % and 43 % respectively. For both yeasts, the anomeric configuration of (1 → 4) linked glucose was investigated by amylase and cellulase hydrolysis, showing α and β residues present in a 2:1 ratio. These results show that, during the brewing process, *S. pastorianus* modifies its cell wall polysaccharides by increasing the amount of (1 → 4) glucans and decreasing (1 → 3) glucans. The final residue mannoproteins, that were resistant to alkaline extraction, had presented immunostimulatory activity with a maximum of 77% activation of B cells with 17 $\mu\text{g/mL}$ of mannoproteins.

The cell wall polysaccharides *S. cerevisiae* from winemaking process and *C. albicans* were also investigated. High amounts of (1 → 4) linked glucose were obtained in the cell wall of *S. cerevisiae*, until 70% for *S. cerevisiae* of white wine. Contrarily, the cell wall of *C. albicans* has a small amount of (1 → 4) linked glucose, less than 5%, and these yeasts are distinguished by a high amount of chitin and high amount of mannoproteins with (1→2) linked mannose.

Concerning the similar polysaccharide composition of *S. pastorianus*, *S. cerevisiae* and *C. albicans*, they have different cell wall proportions and organization. These structural differences in the cell wall allow the survival and adaptation of yeasts to different environments and stresses, and gives them unique features like presence of pathogenicity.

Índice Geral

Índice Geral	i
Índice de Figuras	iii
Índice de Tabelas	iv
Lista de Abreviaturas.....	v
1. Considerações teóricas	1
1.1. A levedura.....	3
1.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Saccharomyces pastorianus</i>	5
1.1.2. <i>Candida albicans</i>	6
1.2. Parede Celular da Levedura.....	8
1.3. Polissacarídeos da parede celular.....	10
1.3.1. Glucanas	10
1.3.2. Manoproteínas	12
1.3.3. Quitina	14
1.4. Atividade biológica dos polissacarídeos da parede celular.....	15
1.4.1. Imunoestimulação.....	16
1.4.2. Antitumoral.....	21
1.4.3. Antiinflamatória.....	22
1.4.4. Antimutagénica e antioxidante	22
1.4.5. Cicatrização	22
1.4.6. Redução do colesterol e glicemia	23
1.4.7. Fibra e prebiótico.....	23
1.4.8. Bioemulsionante	23
1.4. Valorização da levedura excedentária da indústria agroalimentar	24
1.6. Âmbito do trabalho	26
2. Metodologias	27
2.1. Amostras	29
2.2. Determinação do teor de humidade e sólidos na amostra.....	29
2.3. Extração sequencial dos polissacarídeos da parede celular	30
2.4. Análise de açúcares.....	33

2.5.	Determinação de ácidos urónicos	34
2.6.	Análise de ligações glicosídicas.....	35
2.7.	Tratamento enzimático com celulase e α -amilase	36
2.8.	Análise de aminoácidos	37
2.9.	Deteção de fosfato por RMN de sólidos	38
2.10.	Estudo da atividade imunoestimuladora	38
3.	Resultados e Discussão.....	41
3.1.	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	43
3.1.1.	Extração sequencial de polissacarídeos	43
3.1.2.	Análise de Ligações Glicosídicas	48
3.1.3.	Configuração anomérica de 1-4 Glc	53
3.1.4.	Avaliação da atividade imunoestimuladora.....	57
3.2.	Outras leveduras.....	61
3.2.1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	61
3.2.2.	<i>Candida albicans</i>	67
4.	Conclusões.....	75
5.	Trabalho Futuro	79
6.	Referências Bibliográficas.....	83

Índice de Figuras

Figura 1: Filogenia de leveduras da classe Saccharomycetes. A vermelho estão assinaladas as espécies patogénicas, a azul uma espécie patogénica de plantas, e a verde espécies não patogénicas. As setas assinalam as leveduras em estudo no presente trabalho. (Adaptado de Wang <i>et al.</i> [5]).....	4
Figura 2: Microscopia eletrónica (6000x) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> [6].	5
Figura 3: Microscopia eletrónica (1000x) de <i>Candida albicans</i> na forma levedura e hifa [15].	7
Figura 4: Representação esquemática da parede celular da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . (Adaptado de [23, 24].)	9
Figura 5: Estrutura do glicogénio [27].	10
Figura 6: Estrutura de manoproteínas de <i>S. cerevisiae</i> com ligação a proteína tipo N e O. [38].	13
Figura 7: Estrutura de manoproteína do tipo N de <i>Candida albicans</i> [40].	14
Figura 8: Estrutura química da quitina	14
Figura 9: Resposta mediada pela interação β -glucana (<i>zymosan</i>) e recetor dectina-1. (h β GRA e h β GRB são isoformas da dectina-1, as quais aparentam possuir a mesma interação e finalidade) [26].....	19
Figura 10: Mecanismo de imunomodulação de glucanas particuladas via dectina-1 [60].	20
Figura 11: Representação no tempo da valorização da biomassa excedentária de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , (adaptado de Ferreira <i>et al.</i> [81]).	25
Figura 12: Procedimento de extração de polissacarídeos da levedura cervejeira <i>Saccharomyces pastorianus</i> . A azul está destacado o procedimento também realizado para a <i>S. cerevisiae</i> e <i>C. albicans</i>	32
Figura 13: Espetros de RMN 31P do sn_4M KOH (a) e snRF (b) da LEx.....	47
Figura 14: Rendimentos de extração (%) a partir do AIR de a) glucanas da LIn, b) manoproteínas da LIn, b) glucanas da LEx e d) manoproteínas da LEx.....	48
Figura 15: Percentagem molar de α -(1 \rightarrow 4) Glc, β -(1 \rightarrow 4) Glc e β -(1 \rightarrow 3) Glc presentes no resíduo final das LIn e da LEx. (Os resíduos de Glc em ligação (1 \rightarrow 4) com configuração anomérica por caracterizar estão identificados por β -(1 \rightarrow 4) Glc, possivelmente em ligação β).	56
Figura 16: Expressão de CD69 à superfície de linfócitos B (B220) de células esplénicas de ratinhos em meio RPMI (controlo negativo), LPS (controlo positivo) e das amostras LIn RF_Ami, LIn RF_Cel, LEx RF_Ami e LEx RF_Cel.	57
Figura 17: Efeito imunoestimulador em linfócitos B expresso em percentagem de ativação do RPMI (controlo negativo), LPS (controlo positivo) e resíduos da LIn e LEx. (À direita as concentrações no poço ELISA das amostras em açúcares totais).	58
Figura 18: Percentagem de ativação de células B (barras azuis) relacionada com a concentração de manoproteína total (bolas verdes) e ramificação (2 \rightarrow 6)-Man (bolas amarelas).....	60

Índice de Tabelas

Tabela 1: Frações, rendimentos, percentagem molar e concentração de hidratos de carbono (HC) extraídos sequencialmente da levedura <i>Saccharomyces pastorianus</i> do inóculo inicial (LIn).....	43
Tabela 2: Frações, rendimentos, percentagem molar e concentração de hidratos de carbono (HC) extraídos sequencialmente da levedura <i>Saccharomyces pastorianus</i> excedentária (LEx).....	44
Tabela 3: Ligações glicosídicas de frações da extração sequencial do inóculo de <i>S. pastorianus</i> (LIn). (Entre parêntesis encontram-se os valores da análise de açúcares determinadas por GC-FID.).....	49
Tabela 4: Ligações glicosídicas de frações da extração sequencial de <i>S. pastorianus</i> excedentária (LEx). (Entre parêntesis encontram-se os valores da análise de açúcares determinados por GC-FID.).....	50
Tabela 5: Ligações glicosídicas do snRF e RF da LIn com e sem hidrólise enzimática....	53
Tabela 6: Ligações glicosídicas do snRF e RF da LEx com e sem hidrólise enzimática... 54	
Tabela 7: Concentração das diferentes ligações glicosídicas adicionadas aos poços da placa ELISA. (Entre parêntesis encontram-se os valores da análise de açúcares).	59
Tabela 8: Rendimentos, percentagem molar e concentração de hidratos de carbono (HC) extraídos da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	62
Tabela 9: Ligações glicosídicas das quatro frações AIR de <i>S. cerevisiae</i> . Entre parêntesis encontram-se os valores da análise de açúcares	63
Tabela 10: Ligações glicosídicas dos AIRs de <i>S. cerevisiae</i> hidrolisados com α -amilase e celulase	65
Tabela 11: Ligações glicosídicas do AIR das leveduras <i>S. cerevisiae</i> após diálise (5 mudas)	66
Tabela 12: Ligações glicosídicas dos AIRs de <i>C. albicans</i> . (Entre parêntesis encontram-se os valores da análise de açúcares).	69
Tabela 13: Ligações glicosídicas dos AIRs de <i>C. albicans</i> hidrolisados com α -amilase (AMI) e celulase (CEL).	71
Tabela 14: Ligações glicosídicas dos AIRs de <i>Candida albicans</i> após diálise (5 mudas). 72	
Tabela 15: Aminoácidos totais dos AIRs de <i>C. albicans</i>	73

Lista de Abreviaturas

AA – Acetatos de Alditol	LPS - Lipopolissacarídeo
AIR – Resíduo Insolúvel em Álcool	Lys – Lisina
Ala – Alanina	MFF – <i>m</i> -fenilfenol
Ara – Arabinose	mRNA – Ácido Ribonucleico Mensageiro
Asx – Ácido Aspártico / Asparagina	Man – Manose
ATP – Adenosina Trifosfato	MF – Meio da Fermentação
CD – Células Dendríticas	NK – “ <i>Natural Killers</i> ”
CR3 – Recetor do Complemento 3	PBS – Tampão Fosfato Salino
DNA - Ácido Desoxirribonucleico	Phe - Fenilalanina
DMSO – Dimetilsulfóxido	PMAA – Acetatos de Alditol Parcialmente metilados
dRib – Desoxirribose	ppt – Precipitado
EGF - Fator de Crescimento Epidérmico	Pro - Prolina
EtOH – Etanol	RF – Resíduo Final
FACS – Tampão Fluorescence-activated cell sorting	Rha - Ramnose
FF – Final da Fermentação	Rib - Ribose
Fuc - Fucose	rpm – Rotações por minuto
GC-FID – Cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama	RPMI – Meio Roswell Park Memorial Institute
GC-qMS - Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa com analisador quadrupolo	SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
Glc - Glucose	sn - sobrenadante
GlcNAc – N- acetilglicosamina	snRF – Sobrenadante do Resíduo Final
Gly – Glicina	Ser – Serina
Glx – Ácido glutâmico/ Glutamina	TFA – Ácido Trifluoroacético
GR – Grau de Ramificação	Thr - Treonina
GRAS – Geralmente reconhecido como seguro	TNF-α – Fator de Necrose Tumoral α
HC - Hidratos de Carbono	Tyr - Tirosina
HPDEC – Impulso Único com Desacoplamento de Alta Potência	T0 – <i>C. albicans</i> com incorporação de 3 % de Leu
IGF - Fator de crescimento semelhante à insulina	T1 - <i>C. albicans</i> com incorporação de 30 % de Leu
Ile - Isoleucina	T1K1 - <i>C. albicans</i> com incorporação de 50 % de Leu
IL-12 – Interleucina-12	T2K1 - <i>C. albicans</i> com incorporação de 80 % de Leu
Leu – Leucina	T2K2 - <i>C. albicans</i> com incorporação de 99 % de Leu
LEx - Levedura <i>Saccharomyces pastorianus</i> excedentária	Val - Valina
LIn - Levedura <i>Saccharomyces pastorianus</i> do Inóculo Inicial	Xyl – Xilose
	η – Rendimento
	% mol – Percentagem molar

1. Considerações teóricas

1.1. A levedura

A etimologia da palavra levedura deriva do termo em latim “*levare*” ou seja “fazer crescer”, em português conhecido comumente como fermento. Esta associação remonta à descoberta da levedura por associação a processos de fermentação de pão e bebidas, nos quais se verificava um aumento da massa ou volume [1].

As leveduras constituem um grupo de microrganismos eucariotas pertencentes ao Reino Fungi, com mais de 1500 espécies descritas. Caracterizadas por um crescimento unicelular, as leveduras são células esféricas ou elíticas de dimensão variada, uninucleadas e delimitadas por uma parede celular rígida. Podendo reproduzir-se sexuadamente por esporos, a grande maioria destes fungos apresenta uma divisão assexuada por gemulação, na qual por mitose, uma gema formada na superfície do progenitor é libertada originando uma nova célula [2].

As leveduras encontram-se amplamente distribuídas na natureza pelos mais diversos ambientes. Já foram descobertas comunidades de leveduras em condições de temperatura reduzida (leveduras isoladas na Antártida), baixa disponibilidade de oxigénio (trato intestinal de animais) e até locais com baixo potencial de água (ambientes com elevada concentração de açúcar/sal) [3].

O termo levedura é geralmente associado a *Saccharomyces cerevisiae*, nome atribuído por Meyen em 1837 a uma levedura descoberta no malte da produção de cerveja. É provavelmente um dos organismos mais antigos do qual o Homem retira benefícios, estando a sua utilização reportada na Suméria e Babilónia para produção de cerveja há cerca de 8000 anos [1]. Hoje, o impacto das leveduras estende-se muito além da noção original das fermentações de pão, cerveja e vinho por *S. cerevisiae*, encontrando-se implicadas na indústria diversas espécies fermentativas como *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces bayanus* e *Pichia pastoris*. A escolha da espécie de levedura para realizar fermentação depende de parâmetros chave como a sua capacidade de produzir abundantemente etanol, desenvolver aromas, temperatura de atuação e crescimento, facilidade de manipulação e capacidade de tolerar *stress* desencadeado no processo fermentativo [3].

Desde a sequenciação completa do genoma de *S. cerevisiae*, que inúmeras hipóteses de manipulação genética de levedura têm possibilitado a criação de estirpes sustentáveis com maior resistência a temperaturas, etanol, atividades de água reduzidas bem como

melhoria da utilização e alargamento de substratos fermentáveis. A manipulação genética de levedura permite também a produção de compostos com interesse tecnológico para o Homem, como proteínas e fatores de crescimento (IGF, EGF).

As leveduras podem atuar como antifúngico, probiótico e são consideradas uma fonte segura de ingredientes alimentares. No mercado encontram-se disponíveis preparações de levedura cervejeira ou panificadora como suplemento alimentar devido ao seu teor de vitamina B1, proteínas e minerais [3].

A presença de componentes com atividade biológica na constituição da levedura, como glucanas e manoproteínas da parede celular, têm possibilitado uma nova visão na valorização da levedura, em particular para leveduras excedentárias de processos fermentativos, utilizadas essencialmente na alimentação animal [4].

Impactos negativos também estão associados a leveduras, principalmente pela existência de espécies patogénicas envolvidas na origem de diversas infeções e doenças como a *Candida albicans*. As leveduras, para além de uma potencial fonte de alergénios, revelam-se prejudiciais à conservação de alimentos fermentescíveis, como frutas e vegetais [1, 3].

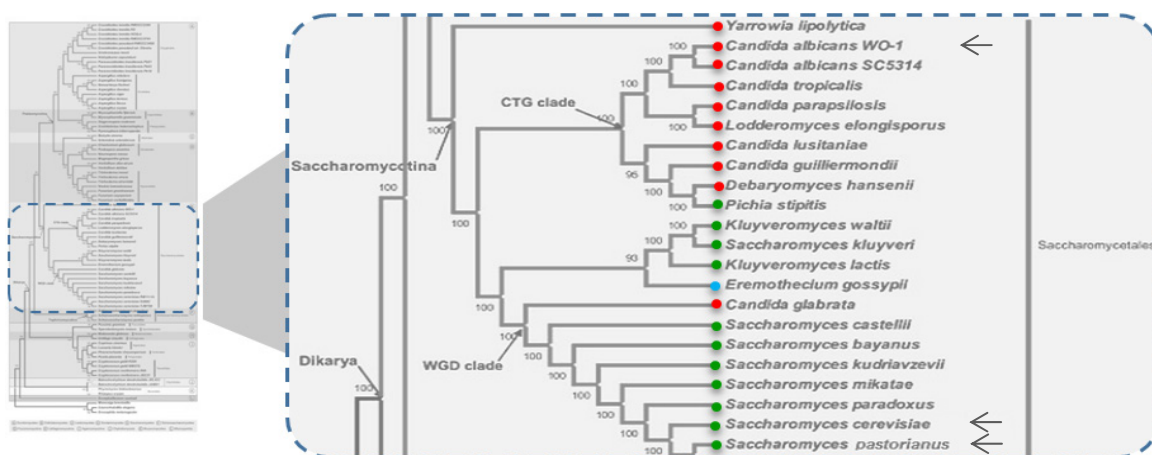


Figura 1: Filogenia de leveduras da classe Saccharomycetes. A vermelho estão assinaladas as espécies patogénicas, a azul uma espécie patogénica de plantas, e a verde espécies não patogénicas. As setas assinalam as leveduras em estudo no presente trabalho. (Adaptado de Wang *et al.* [5])

As leveduras do género *Saccharomyces* e *Candida* pertencem à mesma família, partilhando genes entre si (Figura 1). Contudo, estes dois grupos de leveduras apresentam características fenotípicas completamente distintas como morfologia, presença ou ausência

de patogenicidade. A caracterização estrutural destes microrganismos revela-se importante para compreender o seu fenótipo, por vezes não explicado totalmente pela simples existência dos genes.

1.1.1. *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*

A *Saccharomyces cerevisiae* é descrita como um organismo eucariota modelo, que ao partilhar a maioria das estruturas e atividades funcionais com células de organismos superiores, permite compreender os seus processos genéticos, bioquímicos e metabólicos básicos. É o microrganismo eucariótico mais estudado e aquele cujo genoma foi primeiramente sequenciado. As células de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 2) possuem em geral um formato elipsóide, com diâmetro entre 5 e 10 μm e volume médio entre 29 ou 55 μm^3 , uma coloração creme ou branca e um aspeto cremoso [1].



Figura 2: Microscopia eletrônica (6000x) de *Saccharomyces cerevisiae* [6].

Identificada comumente como a levedura fermentativa, a *S. cerevisiae* é um microrganismo atrativo por não ser patogénico, pela sua facilidade de multiplicação, obtenção, e manipulação genética. Devido à sua longa história no fabrico de produtos fermentados, esta levedura está reconhecida como microrganismo seguro (GRAS - *generally regarded as safe*), fator importante para a sua aplicação na indústria, nomeadamente alimentar e farmacêutica [7].

A *Saccharomyces pastorianus* também denominada como *Saccharomyces carlsbergensis*, é um híbrido alotetraploide parcial entre *S. cerevisiae* e *S. bayanus*, possuindo em simultâneo conjuntos de cromossomas oriundos das duas espécies, exceto no DNA mitocondrial, que deriva apenas de *S. bayanus* [8, 9].

Ambas as leveduras *S. cerevisiae* e *S. pastorianus* são excelentes agentes de fermentação, com grande aplicação industrial. Em anaerobiose, estas leveduras metabolizam açúcares a energia, etanol e CO₂. Produtos de excreção para a levedura, o etanol e CO₂ são essenciais na formulação de produtos fermentados, como o vinho e a cerveja.

A *S. cerevisiae* e a *S. pastorianus* apresentam características distintas na fermentação, que na indústria cervejeira conduz à produção de dois tipos distintos de produto. A *S. cerevisiae* é uma levedura “*top fermenting*” e realiza a denominada fermentação alta. Esta levedura fermenta em poucos dias, a temperaturas altas entre 16 e 25°C, flocula no topo do mosto fermentativo. A *S. pastorianus* é uma levedura “*bottom fermenting*”, e realiza a fermentação baixa. Esta fermentação decorre durante aproximadamente um mês, a temperaturas mais baixas que a anterior, entre 8 e 15°C. A *S. pastorianus*, contrariamente à *S. cerevisiae*, ao flocular sedimenta no fundo dos reatores. A diferença no comportamento das leveduras *bottom e top fermenting* é essencialmente justificada pela hidrofobicidade da sua superfície. Por possuírem maior quantidade de compostos carregados negativamente na sua parede celular, como fosfatos, as leveduras *bottom fermenting* são mais hidrofílicas e têm tendência a flocular formando agregados que depositam no fundo do reator. As leveduras *top fermenting*, por sua vez, por possuírem uma superfície mais hidrofóbica, têm tendência a subir juntamente com o CO₂ formado e a concentrarem-se no topo do fermentador [10].

1.1.2. *Candida albicans*

O género *Candida* é considerado o principal grupo entre as leveduras patogénicas. Compreendendo cerca de 200 espécies, é representado pela espécie *Candida albicans*, um fungo dimórfico, comensal em animais de sangue quente e parte integrante da microbiota do trato genital feminino e do trato gastrointestinal. No entanto, se ocorrer um desequilíbrio na sua relação com o hospedeiro, esta levedura pode tornar-se patogénica, agir como oportunista e desencadear infeções como a candidíase [11].

No Homem, a *C. albicans* é considerada a principal levedura patogénica oportunista por ser a espécie isolada com maior frequência e elevar os níveis de mortalidade em indivíduos imunocomprometidos [12]. As infeções provocadas por *C. albicans* são raras em indivíduos saudáveis. Contudo a debilitação do sistema imunitário do hospedeiro

desencadeia a transição da forma de levedura para hifa patogénica incitando as infeções. Neste sentido, a morfologia de *C. albicans* tem sido foco de pesquisas que revelam associação entre a sua patogenicidade e transição morfológica [13].

A *C. albicans* é capaz de apresentar distintas morfologias entre as formas de levedura e de hifa (Figura 3). As hifas verdadeiras são geradas por gemulação de um micélio na levedura uniforme. Entre as formas bem definidas de levedura arredondada e hifa filamentosa, a *C. albicans* pode formar pseudo-hifas em bastonete, que na realidade são leveduras alongadas unidas entre si [14].

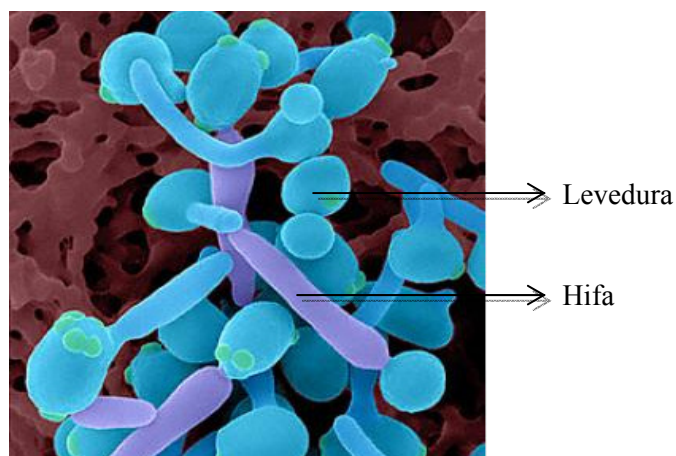


Figura 3: Microscopia eletrônica (1000x) de *Candida albicans* na forma levedura e hifa [15].

Em *Candida*, a variabilidade fenotípica está intimamente ligada com a sua patogenicidade. Como o fenótipo é ditado pelo genótipo e fatores ambientais, em biologia molecular, para elucidação de fenótipos celulares, é comum a indução de mutações genéticas. Uma simples variação num gene pode desencadear alteração no mRNA, proteínas, e/ou metabolitos com consequente alteração do fenótipo que o organismo apresenta. Provocar alteração do fenótipo por mutação em microrganismos patogénicos como *C. albicans*, pode contribuir para a compreensão da relação entre morfologia e patogenicidade.

Em *C. albicans*, variações no fenótipo por recombinação genética foram observadas e interligadas com a sua patogenicidade. Como é possível verificar na figura 1, a *C. albicans* faz parte da clade CTG, ou seja, aquando da síntese proteica, os codões CUG presentes no mRNA são traduzidos como serina (Ser) e não como leucina (Leu), como ditado pelo código genético universal. Esta substituição de um aminoácido hidrofóbico por um hidrofílico na codificação proteica ocorreu algures no tempo durante a evolução destes

fungos [16]. Por mutação induzida e restauro da incorporação de Leu na tradução do codão CUG, a levedura apresentou alterações no seu fenótipo, nomeadamente transição de células brancas arredondadas para células opacas em bastonete, aumento de hifas de floculação e de expressão de uma manoproteína crucial na adesão às células do hospedeiro. É possível assim verificar, que o simples restabelecimento do código genético universal em alteração em *C. albicans* conduziu a alterações celulares importantes para a patogenicidade deste fungo [17, 18].

1.2. Parede Celular da Levedura

O desenvolvimento de uma camada de proteção externa à célula fúngica revela-se crítica para o seu crescimento e sobrevivência em diversos ambientes. Por muito tempo considerado um exosqueleto inerte, hoje a parede celular é vista como uma estrutura dinâmica, de bioquímica única e papel biológico essencial, que se renova e adapta continuamente ao longo do ciclo celular, modificação de tensões e condições ambientais [19]. Localizada na interface do microrganismo com o meio ambiente, a parede representa cerca de 15-30% do peso seco total, revelando-se responsável por funções chave à manutenção da integridade celular. A parede mantém a forma celular, oferece proteção contra *stress* físico e mecânico, estabilização das condições osmóticas, modulação da seletividade e permeabilidade contra agentes externos, controlo do reconhecimento e adesão celular. Em fungos como *C. albicans*, a parede é ainda um fator importante na patogenicidade por ser o contacto primário na interação com o hospedeiro a infectar. Também pela ausência da maioria dos constituintes da parede em células de mamíferos, a parede se revela um alvo atraente no desenvolvimento de antifúngicos [20, 21].

A parede celular de *S. cerevisiae* é composta essencialmente por ~85% do seu peso seco por polissacarídeos e ~15% de proteínas. É comumente aceite que o conteúdo total de polissacarídeos é distribuído em ~60% de glucanas, polímeros de glucose em ligações β -(1→3) e β -(1→6), ~35% de manoproteínas, mananas covalentemente ligadas a proteínas e ~2% de quitina, polímero de N-acetilglucosamina (GlcNAc) em ligação β -(1→4) [21]. Na parede celular de *S. cerevisiae* está referenciada presença de glicogénio, um polímero de glucose em ligação α -(1→4) ramificado com glucose α -(1→6), com uma proporção bastante variável, desde 1 até 23% da massa seca [22].

Quando visualizada por microscopia eletrônica de transmissão, a parede de levedura aparece organizada em duas camadas. Uma camada externa de manoproteínas e uma interna constituída por glucanas e quitina, como esquematizado na figura 4.

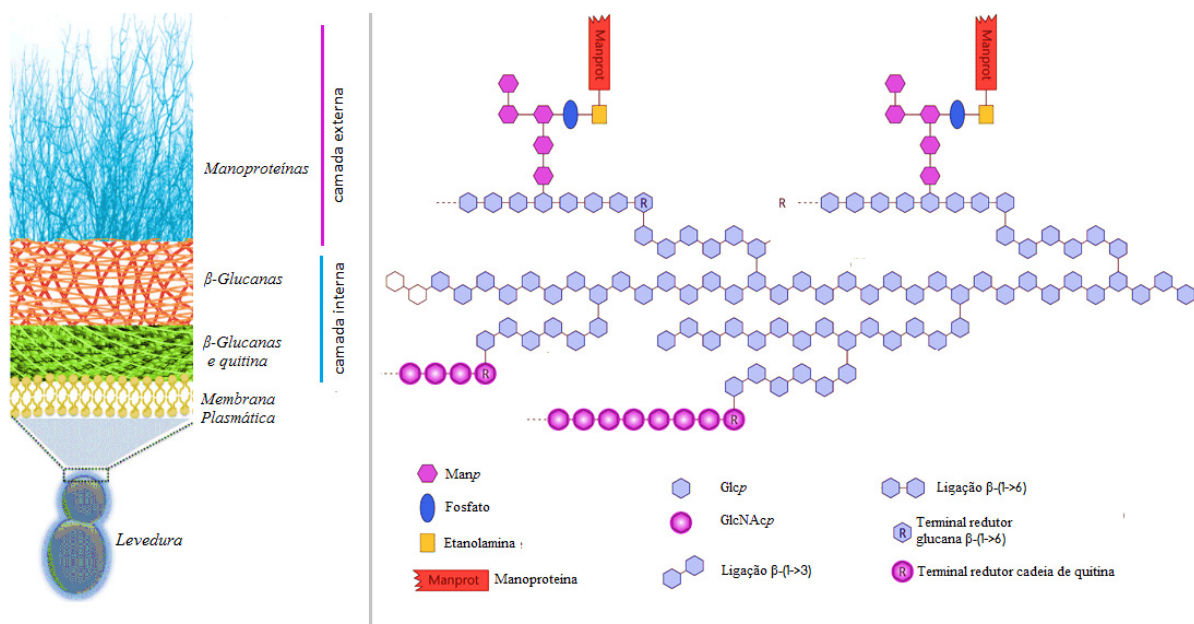


Figura 4: Representação esquemática da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. (Adaptado de [23, 24].)

A camada externa de manoproteínas suporta as proteínas periplasmáticas e limita a permeabilidade celular a macromoléculas, prevenindo o ataque de proteínas estranhas ou a saída para o meio extracelular de compostos intracelulares. A elevada glicosilação das proteínas e a presença de grupos fosfato com cargas negativas na camada externa pode ainda contribuir para a retenção de água. Em contrapartida, na camada interna, as glucanas entrelaçadas por fibrilhas de quitina adjacente à membrana plasmática mantêm a rigidez e a forma celular. São as ligações covalentes e os complexos macromoleculares formados pelas glucanas e quitina que oferecem força e resistência à levedura. Em particular, as glucanas β -(1→3) organizadas numa rede flexível de extensão variada, fortalecida por múltiplas pontes de hidrogénio, permitem elasticidade, podendo a célula adaptar o seu volume em resposta a condições externas. Já as glucanas β -(1→6) servem de âncora para a estrutura e integridade da camada externa de manoproteínas [25].

1.3. Polissacarídeos da parede celular

1.3.1. Glucanas

As glucanas são polissacarídeos constituídos por unidades de D-glucose que se diferenciam pelo tipo de ligação da cadeia principal e pelas ramificações que apresentam [26].

A parede celular de levedura é composta essencialmente por β -glucanas. Contudo, na parede de *S. cerevisiae* está presente glicogénio (Figura 5) uma glucana α -(1 \rightarrow 4) ramificada em α -(1 \rightarrow 4,6). O glicogénio é um polímero de reserva energética essencial para as atividades metabólicas dos organismos especialmente em caso de suprimentos (ex.: nutrientes). Em *S. cerevisiae* o glicogénio surge em duas *pools*, uma solúvel localizada no citosol, outra insolúvel integrante da parede celular estabelecendo uma ligação β -(1 \rightarrow 6) a glucanas β -(1 \rightarrow 3). A proporção do glicogénio em levedura é altamente variável e condicionada pelo estado nutricional, condições ambientais e fase de crescimento celular [22].

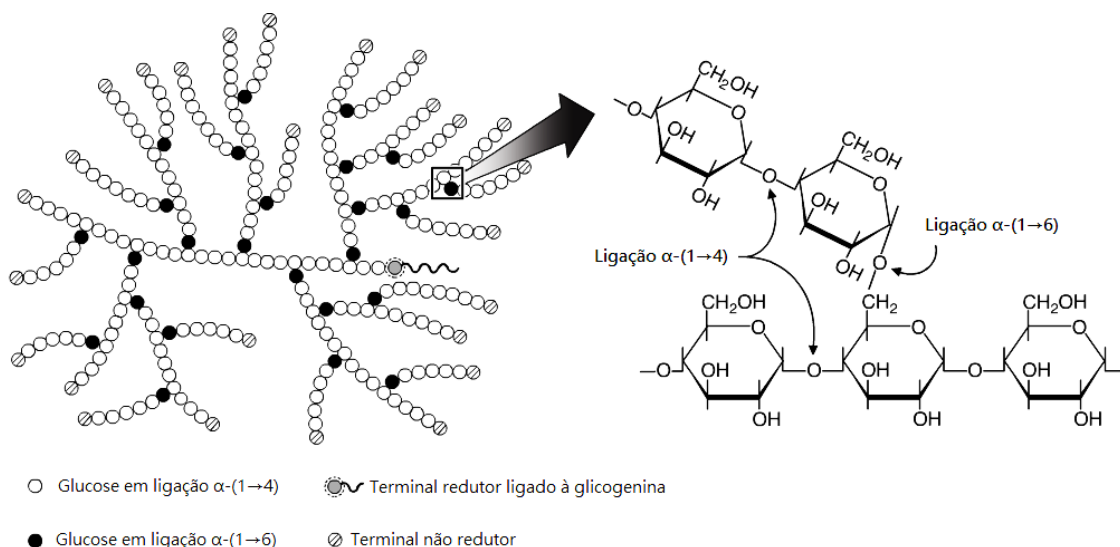


Figura 5: Estrutura do glicogénio [27].

Segundo Kwiatkowski *et al.* [28], a estrutura α -(1 \rightarrow 4)- β -(1 \rightarrow 6)- β -(1 \rightarrow 3) do glicogénio insolúvel, confirmada por RMN ^1H , não é reconhecida por anticorpos de amostras comerciais de amido e glicogénio, incluindo anticorpos do próprio glicogénio da levedura. Esta especificidade confirma as diferenças estruturais entre o glicogénio da pool insolúvel e o glicogénio citosólico em *S. cerevisiae*.

As β -glucanas são um grupo heterógeno de polímeros de glucose amplamente distribuídas na natureza, entre fungos, algas, bactérias e plantas superiores apresentando diversas estruturas. Uma importante fonte de β -glucanas é a parede celular de leveduras onde é o componente maioritário. Em *S. cerevisiae*, as β -glucanas são constituídas por uma cadeia linear de glucose em ligação β -(1 \rightarrow 3), ramificada por uma ligação ainda não caracterizada com cadeias de glucose em ligação β -(1 \rightarrow 6). As glucanas β -(1 \rightarrow 3) ligam também, através dos seus terminais não redutores, cadeias de quitina por ligação β -(1 \rightarrow 4) com o terminal redutor da GlcNAc, e estabelecem ligações alcalino-sensíveis com algumas manoproteínas [29, 30].

Apresentando um grau de polimerização de \sim 1500 resíduos de glucose por cadeia, as glucanas β -(1 \rightarrow 3) constituem 85% das β -glucanas da parede celular. Os demais 15% correspondem a glucanas β -(1 \rightarrow 6), polímeros de glucose mais curtos com uma média de \sim 150 resíduos por cadeia [20].

As glucanas β -(1 \rightarrow 6) contribuem para a manutenção de todos os outros componentes das camadas juntos, formando ligações covalentes com glucanas β -(1 \rightarrow 3), quitina e manoproteínas da parede. Em *Candida albicans*, as glucanas β -(1 \rightarrow 6) são mais abundantes e possuem uma estrutura mais ramificada que em *Saccharomyces cerevisiae* [20, 31].

Considerando a estrutura tridimensional, as glucanas podem assumir três conformações diferentes: espiral aleatória, hélice simples com uma cadeia de polissacarídeo, hélice tripla quando três cadeias que são estabilizadas por pontes de hidrogénio. Entre as conformações descritas, a hélice simples aparenta ser a mais estável, com seis resíduos de glucose por volta, contudo, em soluções aquosas as hélices associam-se em trímeros. Esta conformação tripla é sugerida na literatura como a que apresenta maior atividade biológica, seguida da hélice simples [32].

A estrutura nativa das glucanas, bem como a sua atividade biológica, pode alterar-se durante os procedimentos de extração, especialmente se estes compreenderem condições agressivas, como por exemplo pH e temperatura extremos.

Relativamente à solubilidade as glucanas β -(1 \rightarrow 3) são divididas em glucanas alcalino-insolúveis e alcalino-solúveis. Com uma cadeia principal em ligação β -(1 \rightarrow 3) com 3 a 6% de ligações a glucanas β -(1 \rightarrow 6), as glucanas alcalino-insolúveis representam os componentes maioritários da parede celular de levedura. Por outro lado, as glucanas β -(1 \rightarrow 3) alcalino-solúveis representam 15 a 20% das glucanas da parede celular

diferenciando-se pelo teor superior de ramificações com glucanas β -(1 \rightarrow 6). As glucanas β -(1 \rightarrow 6), sendo polímeros com baixo grau de polimerização e altamente ramificados são designadas como solúveis em água [25, 29].

A solubilidade das glucanas diminui com o aumento do grau de polimerização e glucanas com estrutura alcalino-solúvel tornam-se insolúveis por ligação à quitina, na base da camada interna da parede celular.

Além das glucanas β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6) descritas, as glucanas podem conter também ligações β -(1 \rightarrow 4). A existência de glucanas β -(1 \rightarrow 4) em fungos é relatada na parede do patógeno dimórfico *Sporothrix schenckii*. A camada interna da sua parede na forma levedura contém glucanas solúveis β -(1 \rightarrow 3), β -(1 \rightarrow 6) e β -(1 \rightarrow 4) nas proporções 44, 28 e 28% respetivamente. Já as glucanas insolúveis presentes em *S. schenckii* contêm um teor inferior de ligações β -(1 \rightarrow 4) de aproximadamente 5% [33], proporção igualmente encontrada em *Pichia pastoris* [34]. Recentemente, um conteúdo superior de glucanas β -(1 \rightarrow 4) foi reportado para as frações insolúveis de glucana da levedura cervejeira excedentária *S. pastorianus* [35].

1.3.2. Manoproteínas

As manoproteínas da parede celular são constituídas essencialmente por resíduos de D-manose em ligação α podendo associar por vezes pequenas quantidades de outros açúcares como glucose, galactose e xilose [36].

Com características estruturais únicas entre estirpes de leveduras, as manoproteínas apresentam uma arquitetura básica bastante similar e são divididas em duas classes diferentes (Figura 6). Contendo aproximadamente 10% de proteínas e 90% de carboidratos, as manoproteínas do tipo *N* representa as mananas com ~50 a 200 resíduos de manose dispostos numa cadeia central em ligação α -(1 \rightarrow 6) ramificada com α -(1 \rightarrow 2) e α -(1 \rightarrow 3). Estas efetuam ligações do tipo *N* com as proteínas através de duas GlcNAc e uma asparagina. Com funções essencialmente estruturais, esta classe compreende a maioria das glicoproteínas da parede celular em leveduras. Com um conteúdo de proteína entre 30 a 50%, as manoproteínas do tipo *O* caracterizam-se pelas suas cadeias curtas contendo até 5 resíduos de manose em ligação α -(1 \rightarrow 2) e α -(1 \rightarrow 3) e pela ligação tipo *O* com a proteína, estabelecida através de resíduos de serina ou treonina. Localizadas no espaço

periplasmático, estas manoproteínas são responsáveis por diversas funções enzimáticas [21, 37].

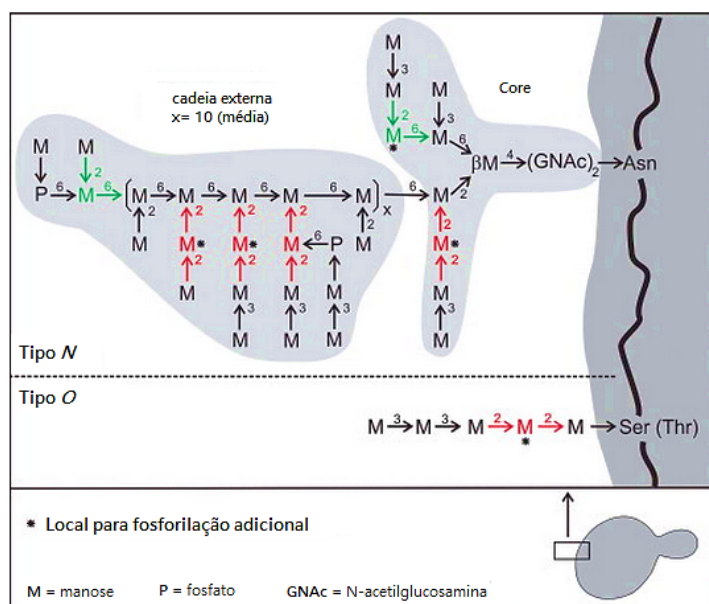


Figura 6: Estrutura de manoproteínas de *S. cerevisiae* com ligação a proteína tipo N e O. [38].

Um outro aspeto estrutural importante prende-se com a presença de fosfato associado às manoproteínas em diversas estirpes de leveduras. Podendo ocorrer em vários locais ao longo das duas classes de leveduras, a substituição com manosilfosfatos em manoproteínas confere carga negativa à superfície celular, relevante para a retenção de água e proteção da parede celular. Em fungos patogénicos como a *Candida albicans*, o conteúdo de manosilfosfato é bastante superior quando comparado com *S. cerevisiae*. Este aspeto é apontado na literatura com um importante fator para a virulência do fungo, nomeadamente no crescimento de hifas e interação com o hospedeiro [39].

Um grau superior de ramificações e a presença de resíduos de manose em ligação β -(1 \rightarrow 2) são outras características que distinguem as manoproteínas de *C. albicans* de *S. cerevisiae*. Reportados como característicos entre espécies de *Candida* conferindo-lhe uma esteroespecificidade única, os β -(1 \rightarrow 2) manosídeos localizam-se nas manoproteínas tipo N essencialmente na parte terminal da fração estável em meio ácido, onde constituem o antígeno 6. No entanto, a sua presença é também detetada na fração ácido-lábil onde integram o antígeno 5 do patogénio. A estrutura da manoproteína tipo N de *C. albicans* encontra-se representada na figura 7 [40].

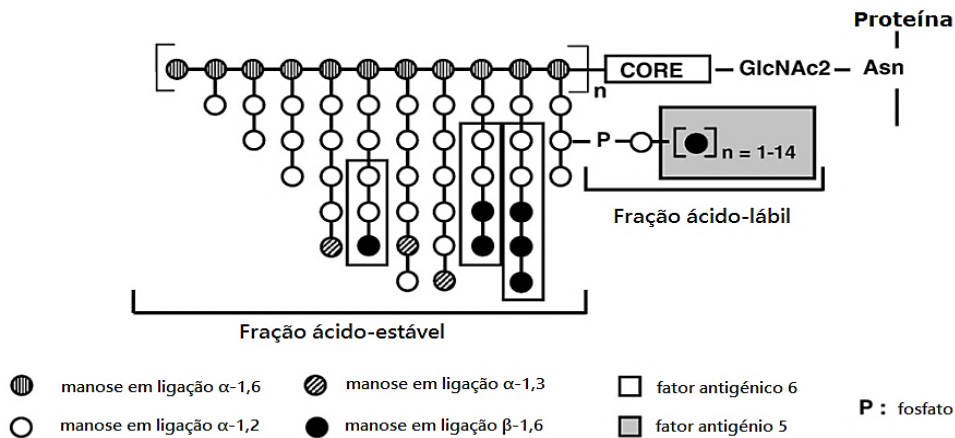


Figura 7: Estrutura de manoproteína do tipo N de *Candida albicans*[40].

As manoproteínas, no geral, podem apresentar diversas funções na célula, desde controlo da permeabilidade, regulação osmótica, adesão, floculação, propriedades antigénicas e até de patogenicidade [36].

1.3.3. Quitina

A quitina (Figura 8) é um polímero linear de N-acetilglucosamina em ligações β -(1 \rightarrow 4). As cadeias de quitina podem compreender entre ~100 a 190 resíduos de GlcNAc, estando maioritariamente ligada aos terminais não redutores de glucanas β -(1 \rightarrow 3) por ligação β -(1 \rightarrow 4), podendo no entanto ligar cadeias β -(1 \rightarrow 6) particularmente na resposta da parede celular a *stress*. Quando a integridade da parede celular se encontra comprometida em resposta a fatores de *stress*, a síntese de quitina é estimulada para prevenir a morte celular [37, 41]. Embora seja o menor componente da parede celular, a quitina contribui para a resistência da parede e para a cicatrização no local de divisão celular [37].

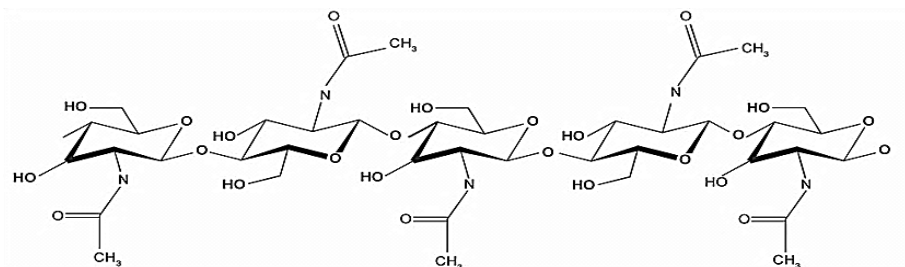


Figura 8: Estrutura química da quitina

1.4. Atividade biológica dos polissacarídeos da parede celular

As glucanas e as manoproteínas constituintes da parede celular das leveduras apresentam diversas atividades biológicas com interesse tecnológico. Neste contexto, a parede celular da levedura tem-se destacado como fonte de polissacarídeos com potencial, para os quais métodos de extração têm sido desenvolvidos.

O *zymosan* é um extrato insolúvel obtido da parede celular de *S. cerevisiae* com diversas atividades biológicas. A composição do *zymosan* inclui proteínas, lípidos, quitina, mananas e β -glucanas, e as funções biológicas do extrato têm sido atribuídas ao seu componente maioritário, as glucanas β -(1 \rightarrow 3). Contudo, foi após a obtenção e comercialização do *zymocel* em 1980, um extrato puro de β -glucanas derivado do *zymosan*, que foi provado que a atividade biológica do extrato provinha essencialmente destes polímeros [41, 42].

As glucanas são os polissacarídeos mais estudados relativamente à atividade biológica, principalmente as glucanas em ligação β -(1 \rightarrow 3). Contudo foi desde a descoberta do *zymosan* que diversos estudos têm sido realizados para elucidar as atividades biológicas de β -glucanas. Entre imunoestimulação, atividade antitumoral, antiinflamatória, antimutagénica, hipocolesterolémica, hipoglicémica, são diversos os benefícios associados a β -glucanas obtidas da parede celular das leveduras [43].

Embora exista um número considerável de publicações sobre os efeitos biológicos das glucanas, a literatura é inconsistente e por vezes contraditória, devido ao estudo de glucanas com diferentes origens, massas moleculares e modificações químicas. Apesar de se saber que a atividade é influenciada pelo tamanho do polímero, grau de ramificação e estrutura terciária, não existe um consenso sobre a estrutura básica requerida para que a glucana seja biologicamente ativa [26, 44].

Também o método de extração aplicado pode afetar a estrutura e consequentemente a atividade das β -glucanas. Diversos métodos de extração envolvendo soluções alcalinas, ácidas, solventes orgânicos têm sido propostos [45-47]. Com vista à preservação estrutural, maior rentabilidade de processo e sustentabilidade têm sido propostas metodologias de extração de glucanas envolvendo hidrólises enzimáticas ou soluções não agressivas ao ambiente [48, 49]. O método escolhido para secagem das glucanas como também

influencia a estrutura afeta consequentemente a atividade dos polímeros. Entre os métodos liofilização, *spray drying* e extração por solvente, existe maior retenção da atividade das glucanas quando aplicado o *spray drying* [50].

Relativamente às α -(1→4)-glucanas da parede celular de leveduras não há informação sobre a sua bioatividade como fração isolada, talvez consequência do reconhecimento das α -(1→4)-glucanas como glicogénio de armazenamento energético [51]. No entanto, um polissacarídeo do tipo glicogénio do cogumelo *Lentinula edodes* mostrou atividade imunoestimuladora de macrófagos à produção de TNF- α e fagocitose [52]. Outra α -(1→4)-glucana do tipo glicogénio isolada da planta medicinal *Tinospora cordifolia* foi descrita com capacidade de ativação de macrófagos e produção de citocinas [53]. Perante isto, é possível que o glicogénio da parede celular de levedura também possuía atividade biológica.

As manoproteínas também apresentam diversas atividades biológicas, como imunoestimulação, inibição de tumores, efeitos hematopoiéticos e radioprotetores, podendo ser ainda utilizadas como imunoadjuvantes [36]. Tal como nas glucanas, as propriedades bioativas das manoproteínas são afetadas pela conformação espacial, solubilidade, peso molecular e método de extração, não existindo, contudo, informação concreta sobre estes fatores.

Nas últimas décadas, vários métodos de isolamento de manoproteínas da parede celular de levedura têm sido descritos, envolvendo extrações ácidas ou alcalinas. Com elevado rendimento de extração, a aplicação de uma simples extração com água quente foi revelada recentemente como uma boa metodologia, na qual a estrutura das manoproteínas é preservada assim como a sua bioatividade [30, 54].

1.4.1. Imunoestimulação

Considerada a atividade biológica mais importante, o efeito imunomodelador das β -glucanas ocorre tanto na imunidade humoral como celular, e os mecanismos desencadeados podem envolver o estímulo da hematopoiese, ativação de linfócitos, macrófagos, células endoteliais e dendríticas, bem como desencadeamento de uma resposta

imune específica. Apesar dos inúmeros estudos realizados, os mecanismos de ação imunomodulatória não estão ainda bem esclarecidos. Contudo, aparentam estar relacionados com fatores estruturais das β -glucanas como grau de ramificação, solubilidade em água, peso molecular e conformação terciária do polímero.

O grau de ramificação (GR), por se relacionar com a solubilidade das glucanas, é uma importante condicionante da atividade biológica. As glucanas muito ramificadas e portanto solúveis em água são as mais eficientes na ativação da resposta imune, em concreto com GR situados no intervalo 0,20 e 0,33. No entanto este intervalo não é regra obrigatória, pois existem glucanas biologicamente ativas com grau de ramificação inferior (0,04) e até superior (0,75) [55].

Um outro fator importante é o peso molecular, estando evidenciado que as glucanas mais eficientes são as de elevada massa molecular, entre 100 a 200 kDa. Estas glucanas têm capacidade de ativar diretamente leucócitos, estimulando a sua capacidade fagocítica e citotóxica, e induzir produção de mediadores proinflamatórios chave como citocinas e quimiocinas. As β -glucanas de peso intermédio ou baixo são biologicamente ativas, contudo os efeitos celulares são os menos conhecidos. Em contraste, glucanas muito pequenas, com massa molecular entre 5-10 kDa são geralmente consideradas inativas para imunomodulação [44, 55].

Em relação à conformação espacial biologicamente mais ativa, há estudos apontam para a conformação em hélice simples, enquanto outros defendem maior atividade para a hélice tripla. A hélice tripla em soluções aquosas é referida como a conformação mais estável, estabilizada por ligações de hidrogénio intra- e inter- cadeia, sendo esta conformação apenas possível para polímeros com peso molecular superior a 90 kDa. Neste contexto, as glucanas de elevada massa molecular e em conformação de hélice tripla são sugeridas como as melhores indutoras de resposta imune [55].

Com uma massa molecular de 157 kDa e conformação em hélice tripla, a glucanafosfato é uma glucana linear em ligação β -(1 \rightarrow 3) com 1 grupo fosfato em C-6 a cada 7 resíduos de glucose. A presença de fosfato na glucana poderá ser um fator estrutural importante para a atividade imunoestimuladora observada [56, 57].

Também a longa permanência das glucanas no sistema dos mamíferos, por ausência de β -glucanases, contribui para a sua disponibilidade e consequente atividade biológica. As glucanas acumulam no fígado sem sofrer grandes alterações e sua eliminação *In vivo*

depende da massa molecular. As glucanas mais pequenas são excretadas por filtração glomerular, e as glucanas de tamanho superior são retidas no fígado onde sofrem degradação pelas células de *Kupffer* [58, 59].

Os estudos da imunoestimulação de β -glucanas diferenciam geralmente a atividade exercida entre glucanas solúveis e em partículas. As glucanas particuladas são suspensões de glucanas de elevada massa molecular, >100 kDa, e por isso insolúveis em água. A investigação da sua atividade é geralmente realizada com *Zymosan*, do qual fazem parte [42]. Apesar de estar reportada a atividade biológica tanto para glucanas solúveis como particuladas, as glucanas particuladas apresentam um efeito estimulador superior [60]. A diferença de atividade entre estas glucanas aparentemente pode ser justificada pelo reconhecimento diferencial que ocorre nos recetores do hospedeiro [61].

É pelo reconhecimento de microrganismos ou substâncias antigénicas em receptores da superfície celular que se dá início a uma resposta do sistema imunitário. A presença de receptores para β -glucanas foi demonstrada em células pertencentes ao sistema imune como monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e células natural *killer* (NK), mas também em células de *Langerhans*, endoteliais, do epitélio alveolar e fibroblastos [26]. Até à data são conhecidos quatro tipos diferentes de recetores para β -glucanas: recetor do complemento 3 (CR3), lactosilceramida (CDw17), recetores *scavenger* e dectina-1 (β GR). O mecanismo de resposta parece ser mediado pela interação destes, contudo apenas o papel da dectina-1 se encontra mais elucidado [62].

A dectina-1 é uma glicoproteína transmembranar do tipo II, identificada na superfície de células dendríticas, monócitos e neutrófilos. Em colaboração com receptores *Tool-like*, a dectina-1 induz fagocitose, endocitose, *burst* oxidativo e produção de citocinas pró-inflamatórias, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-12 (IL-12), (Figura 9) [26].

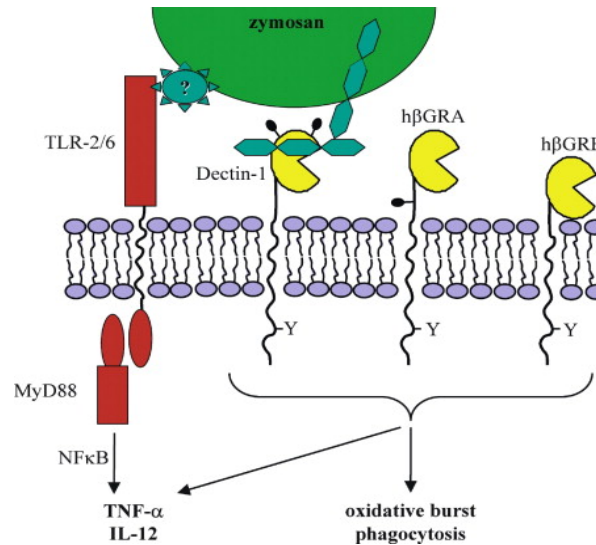


Figura 9: Resposta mediada pela interação β-glucana (*zymosan*) e recetor dectina-1. (hβGRA e hβGRB são isoformas da dectina-1, as quais aparentam possuir a mesma interação e finalidade) [26].

A dectina-1 é essencial para que ocorra resposta mediada por glucanas particuladas através do mecanismo de ação descrito na figura 10. As glucanas particuladas são absorvidas pelas células M do lúmen do intestino delgado para as placas de Peyer, ou através de projeções de células dendríticas (CD). Nas placas de Peyer os macrófagos e as CD endocitam e fragmentam as glucanas particuladas em fragmentos menores, os quais são libertados nos nódulos linfáticos, juntamente com citocinas. Os fragmentos por sua vez ativam células NK e granulócitos por ligação ao CR3, numa cascata de eventos que culmina com controlo de infeções e controlo do desenvolvimento de tumores [60].

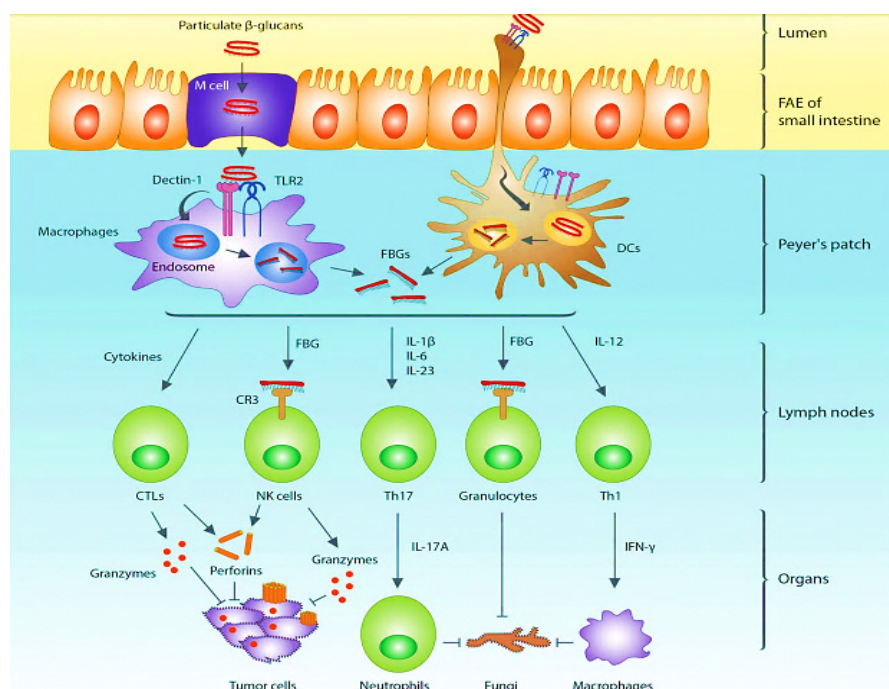


Figura 10: Mecanismo de imunomodulação de glucanas particuladas via dectina-1 [60].

As glucanas solúveis por sua vez, não dependem da dectina-1 para exercer a ação imunoestimuladora. Quando ligam a este recetor pouco ou nenhum efeito é observado e, como tal, as β -glucanas solúveis não possuem capacidade de ativar diretamente macrófagos ou DC. A sua ação dá-se por ativação do complemento 3 com produção de mediadores inflamatórios. As glucanas solúveis são excelentes adjuvantes de terapias, aumentando por exemplo a eficácia de tratamentos com anticorpos monoclonais [63, 64].

Apesar da sua atividade imunoestimuladora superior, as glucanas particuladas têm-se demonstrado ser impróprias para a aplicação médica devido aos efeitos adversos causados. Devido a características estruturais, especialmente ao tamanho das preparações (1-3 μm), a administração intravenosa de glucanas particuladas é geralmente acompanhada de dores, febres, náuseas, vômitos, entre outros. Por outro lado, a deposição destas glucanas no fígado pode levar a hepatoesplenomegalia e formação de granulomas. Neste sentido, a solubilização de glucanas é sugerida como a via mais viável porque, embora menos ativas, as glucanas solúveis não possuem tantos efeitos adversos associados [60, 64].

De um modo geral, as glucanas β -(1 \rightarrow 3) estimulam a produção e o fluxo de novos imunócitos na corrente sanguínea, que por sua vez nos órgãos linfóides oferecem proteção

contra potenciais invasores do hospedeiro. A imunoestimulação é particularmente importante em casos de *stress* extremo, em que o sistema está particularmente debilitado devido a tratamentos de quimioterapia ou radiação [43].

A imunoestimulação desencadeada por manoproteínas de levedura não está tão descrita como para as glucanas, devido ao reduzido número de estudos de atividade biológica realizados com manoproteínas. Contudo, as manoproteínas apresentam capacidade de estimular neutrófilos e macrófagos potenciando a secreção de mediadores químicos como o TNF- α e IL-12 [65]. Além disto, a capacidade de induzir a produção de anticorpos específicos importantes na resposta imune humoral contra antígenos não relacionados, faz das manoproteínas adjuvantes eficientes e seguros [66, 67].

Foi observado que as manoproteínas da parede celular de *S. cerevisiae* possuíam capacidade de estimular a imunidade mediada por células T [54], e que as mananas purificadas da parede de *S. cerevisiae* e *C. albicans* induziam a produção de TNF- α em monócitos humanos [65]. Também as manoproteínas da *Saccharomyces uvarum*, quando administradas intravenosamente a ratinhos, exibiram capacidade de estimular respostas primárias e secundárias do sistema imunitário [68].

Praticamente não existe informação sobre a relação estrutura-atividade das manoproteínas, no entanto em oligomananas purificadas de *S. cerevisiae* verificou-se que a sequência terminal α -(1 \rightarrow 3)-Man- α -(1 \rightarrow 2)-Man era importante para a imunoestimulação de células B em ratinhos [69].

Outras atividades como a estimulação de hematopoiese, e prevenção ou eliminação da colonização por bactérias enteropatogênicas no trato gastrointestinal do hospedeiro são baseadas na atividade imunoestimuladora das manoproteínas [36, 70, 71].

1.4.2. Antitumoral

A atividade antitumoral das β -glucanas e manoproteínas decorre com mecanismos de ação semelhantes à imunoestimulação. A ativação e a ampliação das funções imunológicas do hospedeiro melhora significativamente a sobrevivência ao tumor. As glucanas β -(1 \rightarrow 3) revelaram-se importantes adjuvantes em quimioterapia com capacidade de diminuir efeitos adversos de drogas atualmente utilizadas no combate ao cancro, como a ciclofosfamida [64, 72].

1.4.3. Antinflamatória

A prevenção de infecções é outros dos efeitos biológicos importantes das β -glucanas. Estes polímeros conseguem elevar a resistência a diversas infecções por induzir a produção de monócitos e neutrófilos e estimular a atividade fagocitária de leucócitos apresentando um efeito sinérgico com antibióticos administrados ao paciente [43]. O uso de β -glucanas pode ser particularmente importante para as infecções pós-cirúrgicas, que ocorrem em ~25% dos casos. Estudos clínicos em humanos comprovaram uma redução de 39% de infecções pós-operatórias, por promoção da fagocitose de bactérias patogênicas, bem como estímulo à migração de neutrófilos para o local da infecção [73].

Eliminando as bactérias em circulação na corrente sanguínea, as β -glucanas reduzem a ocorrência de choque séptico, no qual a falência circulatória pode por em risco a vida do paciente [64].

1.4.4. Antimutagénica e antioxidante

A atividade antimutagénica de glucanas β -(1 \rightarrow 3) dá-se pela diminuição dos efeitos prejudiciais de compostos potencialmente mutagénicos como o peróxido de hidrogénio e a ciclofosfamida. A prevenção de danos no DNA pode também decorrer pela reação das β -glucanas com radicais OH \cdot , libertados na biotransformação do peróxido de hidrogénio [64].

Também as manoproteínas isoladas de parede celular da levedura demonstram capacidade de neutralizar radicais livres de oxigénio e diminuir as lesões no DNA exposto a agentes mutagénicos. Um poder antioxidante superior é observado em manoproteínas obtidas da parede de *C. albicans*. Este poder antioxidante estará relacionado com a existência em *C. albicans* de ligações β -(1 \rightarrow 2) ausentes em *S. cerevisiae* [40].

Em adição à atividade antimutagénica e antioxidante comprovada, a solubilidade em água e a reduzida massa molecular (15-30 kDa), fazem das manoproteínas uns promissores agentes naturais de proteção [36].

1.4.5. Cicatrização

A atividade de macrófagos desempenha um papel fundamental na cicatrização de tecidos, pós cirurgia ou trauma. Tanto as β -glucanas solúveis e particuladas ao estimularem a atividade de macrófagos têm efeitos positivos na biossíntese e deposição de colagénio, reepitelização e aumento da resistência do tecido cicatricial [74]. Esta propriedade é

especialmente importante em diabéticos, que naturalmente apresentam maior suscetibilidade à infecção, ocorrência de úlceras e atraso no processo de cicatrização [75].

Já existe possibilidade de aplicação de glucanas β -(1 \rightarrow 3) na composição da chamada “pele bioartificial”, uma pele artificial obtida a partir da cultura de fibroblastos e queratinócitos num meio contendo glucanas β -(1 \rightarrow 3) e gelatina [76]. Esta foi aplicada com sucesso no tratamento de feridas, verificando-se que a glucana era capaz de promover um aumento da reepitelização.

1.4.6. Redução do colesterol e glicemia

Foi comprovada em humanos a eficácia das β -glucanas em baixar os níveis de lípidos e colesterol da circulação sanguínea. Reduzir os níveis de lípidos sanguíneos, o colesterol total e LDL é a melhor forma de prevenir pressão arterial elevada e casos de arteriosclerose. Como as β -glucanas de levedura são reconhecidas como seguras (GRAS) revelam-se um poderoso e barato aditivo alimentar no combate ao colesterol, e um adjuvante das atuais drogas existentes no mercado, que possuem elevado custo e efeitos secundários indesejáveis associados [74, 77].

Uma redução da glicemia e insulina pós-prandial foi também observada aquando da ingestão de glucanas solúveis. Esta atividade é particularmente importante como auxiliar no tratamento de doenças como a diabetes ou no controlo da obesidade [43].

1.4.7. Fibra e prebiótico

Por ausência de β -glucanases no organismo humano e resistência a meio ácido, as β -glucanas não são degradadas ao longo do trato gastrointestinal, sendo por isso classificadas como fibra dietética. Úteis na prevenção de doenças, controlo de obesidade e tratamento de problemas digestivos, as β -glucanas atuam também como prebióticos ao estimular o crescimento da flora microbiana intestinal, como bactérias ácido-láticas do género *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, promovendo equilíbrio e efeitos benéficos à saúde do hospedeiro [43].

1.4.8. Bioemulsionante

Os bioemulsionantes são compostos de origem biológica capazes de estabilizar emulsões. Estes têm vindo a ganhar espaço no mercado devido à crescente procura dos consumidores pelos produtos naturais, mas também por apresentarem custos de produção e riscos para a saúde humana inferiores. Uma outra característica importante dos bioemulsionantes é a sua biodegradabilidade, evitando problemas de toxicidade e aumentando o potencial industrial, nomeadamente no setor alimentar [78].

Vários estudos indicam propriedades bioemulsionantes para as manoproteínas da parede celular de estirpes de *Saccharomyces*. A composição destes polímeros, nomeadamente cadeias hidrofilicas de manose covalentemente ligadas a proteínas, formam uma estrutura anfipática responsável pelas propriedades emulsionantes [78-80].

Segundo Barriga *et al.*, as propriedades emulsionantes das manoproteínas devem-se essencialmente ao teor proteico. Ao fracionarem as manoproteínas extraídas de *S. cerevisiae* verificaram que a fração contendo maioritariamente proteína apresentava uma excelente capacidade emulsionante, superior à própria manoproteína não fracionada. Por outro lado, a fração contendo elevado teor de manoproteínas e fosfato, por ser muito solúvel em água não atuava como emulsionante, mas contribuía para a estabilidade da emulsão formada [79].

1.4. Valorização da levedura excedentária da indústria agroalimentar

A indústria agroalimentar gera anualmente grandes quantidades de resíduos cuja valorização é mínima ou nula. Atualmente apenas uma parte dos resíduos gerados é reaproveitada para alimentação animal ou para compostagem, quando na sua constituição estão presentes quantidades importantes de nutrientes e compostos bioativos. Assim, num mercado global extremamente competitivo, descobrir vantagens nutricionais ou ingredientes bioativos que permitam extrair benefícios de produtos de baixo valor como resíduos agroalimentares é um importante estímulo à sua valorização.

A levedura é um subproduto de processos fermentativos industriais, sendo a *Saccharomyces* o segundo maior subproduto produzido pela indústria cervejeira, com 10-14% dos sólidos produzidos. Esta levedura excedentária é uma fonte rica de proteína, vitaminas do complexo B, ácidos nucleicos e minerais, podendo atualmente encontrar aplicação na nutrição animal e humana, como substrato para cultura de microrganismos,

reutilização em processos fermentativos e produção de aditivos alimentares. A biomassa da levedura excedentária pode também ser utilizada para a biorremediação, como agente de desintoxicação de metais e corantes de efluentes, (Figura 11) [81].

Os polissacarídeos da levedura excedentária apresentam diversas atividades biológicas comprovadas. Neste sentido a utilização destes compostos bioativos, especialmente β -glucanas, na produção de alimentos funcionais revela-se uma boa possibilidade de valorização. Como alimento funcional, os polissacarídeos podem promover benefícios biológicos e reduzir o risco de doenças ao consumidor como simples integrantes da sua dieta diária [82].

Em paralelo com as atividades biológicas, as β -glucanas e as manoproteínas podem ser aplicadas na indústria alimentar como emulsionantes, estabilizantes ou gelificantes contribuindo para a formulação de alimentos com baixo teor de gordura e calorias [83].

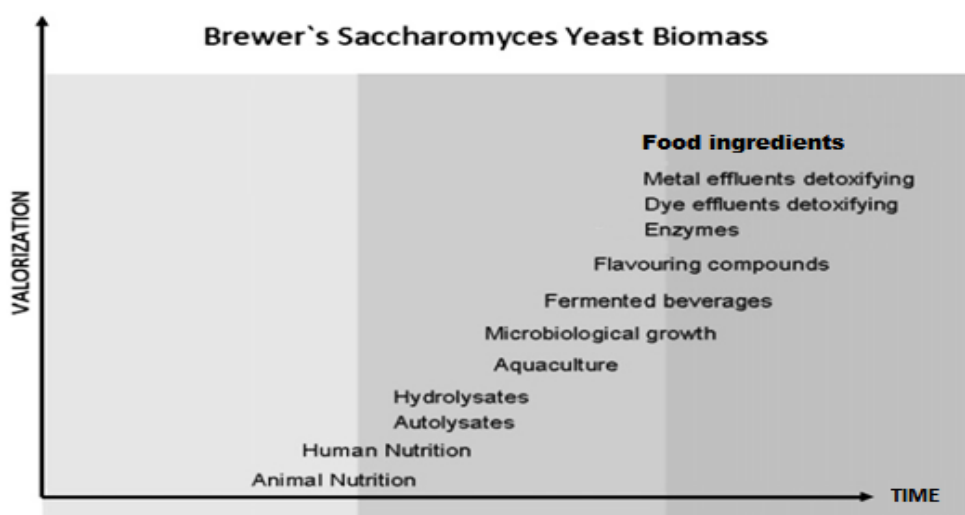


Figura 11: Representação no tempo da valorização da biomassa excedentária de *Saccharomyces* cervejeira, (adaptado de Ferreira *et al.* [81]).

1.6. Âmbito do trabalho

Os polissacarídeos da parede celular de *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, e *Candida albicans* foram investigados com vista a:

- Caraterizar estruturalmente o tipo de glucanas e manoproteínas presentes nas leveduras, bem como as ligações glicosídicas que estabelecem.
- Comprovar a presença de ligações β (1 \rightarrow 4) nas glucanas da levedura cervejeira excedentária *S. pastorianus*, e averiguar a sua existência em *S. pastorianus* não sujeita ao processo fermentativo cervejeiro (inóculo inicial)
- Investigar se na levedura de fermentação vínica *S. cerevisiae*, próxima filogeneticamente a *S. pastorianus* e na levedura com relação mais distante *C. albicans* existem glucanas com ligações β (1 \rightarrow 4).
- Caraterizar os polissacarídeos da parede celular de *C. albicans* mutante e relacionar possíveis alterações no fenótipo com a sua patogenicidade.

2. Metodologias

2.1. Amostras

No presente trabalho foram estudadas três espécies distintas de levedura: *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. A empresa Unicer Bebidas, SA cedeu a levedura *Saccharomyces pastorianus* de duas fases distintas de recolha. Levedura inicial (LIn), *S. pastorianus* de 4ª geração não sujeita a fermentação e levedura excedentária (LEx) filtrada utilizada em 3 a 7 ciclos fermentativos do processo cervejeiro.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi cedida pela Doutora Ana Catarina Gomes (Biocant). Foram usadas 4 amostras conforme o tipo de vinho e etapa de recolha na fermentação.

A levedura *Candida albicans* foi cedida pelo laboratório do Professor Doutor Manuel Santos, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro. Foram analisadas 10 amostras de *C. albicans*, 5 recolhidas na fase exponencial e 5 na fase estacionária de crescimento. É designada por T0 a *C. albicans* controlo, sem modificação genética, T1, T1K1, T2K1, e T2K2 a *C. albicans* com 21, 51, 81 e 99 % de modificação, respetivamente.

2.2. Determinação do teor de humidade e sólidos na amostra

Os teores de humidade e sólidos foram determinados para a levedura *S. pastorianus* (LIn e LEx) por secagem em estufa e perda de peso das amostras.

As caixas de pesagem utilizadas foram previamente secadas numa estufa a 105°C durante 1 h e arrefecidas num exsiccador por 30 min. De seguida pesaram-se cinco caixas e a cada uma foram adicionadas 8 g de levedura homogeneizada. As caixas contendo levedura foram colocadas na estufa a 105 °C por 2 h, arrefecidas num exsiccador por 30 min e posteriormente foram pesadas. Este processo de secagem e pesagem foi realizado até registo de peso constante.

Para o cálculo das percentagens de humidade e sólidos consideraram-se as seguintes relações:

$$\text{a) Sólidos (\%)} = \frac{\text{massa amostra seca}}{\text{massa amostra inicial}} \times 100 \qquad \text{b) Humidade (\%)} = 100 - \text{Sólidos (\%)}$$

2.3. Extração sequencial dos polissacarídeos da parede celular

As leveduras *S. pastorianus*, *S. cerevisiae* e *C. albicans* foram inicialmente submetidas a radiação ultrassônica durante 15 min à temperatura ambiente. De seguida as soluções foram centrifugadas a 15000 rpm durante 20 min a 4 °C, e o material solúvel foi separado do resíduo. O material solúvel foi precipitado em etanol 80% a 4°C durante 2 h e centrifugado a 15000 rpm durante 20 min a 4°C. Separados o precipitado (ppt_EtOH_US) e o sobrenadante (sn_EtOH_US), concentraram-se as frações a pressão reduzida num evaporador rotativo sem deixar secar. As frações foram diluídas com água destilada duas vezes e novamente concentradas, garantindo a remoção do etanol. Posteriormente as frações foram congeladas a -20°C e liofilizadas.

O resíduo obtido do tratamento com ultrassons foi suspenso em etanol 80% e levado a ebulição por 10 min. Em seguida o material foi filtrado em vácuo com funil de placa porosa 3, o precipitado foi lavado 3 vezes com etanol 95% e uma vez com acetona. O filtrado (EtOH_AIR) foi diluído e concentrado no evaporador rotativo 2 vezes, congelado e depois liofilizado. O material retido na filtração (resíduo insolúvel em álcool - AIR), foi colocado numa caixa de Petri para secagem à temperatura ambiente.

Apenas aos AIRs da levedura *S. pastorianus* LIn e LEx foram realizados os passos posteriores de extração com água quente e soluções alcalinas de concentração crescente. As soluções utilizadas foram preparadas numa proporção de 1:16 de massa seca de AIR para volume de solução. Assim, para 12,15 g de AIR obtido da levedura inicial e 15,02 g de AIR da levedura excedentária foram utilizadas soluções na extração com volume final de 190 e 230 mL respetivamente.

A massa de AIR de cada levedura foi suspendida no volume adequado de água destilada, e a extração decorreu a 100 °C num frasco fechado durante 15 min a 400 rpm de agitação. A solução foi centrifugada a 15000 rpm durante 20 min a 4°C, o sobrenadante (sn_H₂O_{100°C}) obtido foi concentrado a pressão reduzida, congelado e liofilizado, e o resíduo foi submetido a extrações alcalinas.

As extrações alcalinas de polissacarídeos foram realizadas sequencialmente com soluções de KOH de concentração, nomeadamente 0,1, 1 e 4 M. As soluções alcalinas foram preparadas com água destilada previamente fervida durante 20 min e arrefecida sob atmosfera de azoto para remoção do oxigénio dissolvido. Para prevenir a degradação dos

polissacarídeos por β -eliminação, as soluções de KOH foram preparadas contendo 200 mM do agente redutor NaBH₄.

As extrações com KOH foram realizadas à temperatura ambiente durante 2 h com agitação. Terminada cada extração, a solução resultante foi centrifugada a 15000 rpm, 20 min a 4 °C, e o material extraído (sobrenadante) separado do resíduo era usado na extração alcalina seguinte. Cada fração de material extraído foi neutralizada até pH 5 com ácido acético glacial e seguidamente dialisada em membranas de poro 12-14 kDa. Terminada a diálise o conteúdo retido pelas membranas foi centrifugado a 15000 rpm durante 20 min a 4°C, e o sobrenadante recolhido foi concentrado a pressão reduzida. Tanto o sobrenadante como o precipitado foram congelados e liofilizados.

Após a extração de 4 M de KOH, o material solubilizado sofreu o mesmo procedimento que os precedentes. O resíduo obtido foi suspenso em água destilada, neutralizado a pH 5, dialisado e centrifugado obtendo-se um sobrenadante (sn_RF) e um resíduo final (RF), que foram congelados e liofilizados.

Todas as diálises foram realizadas a 4°C em 10L de água e com umas gotas de clorofórmio e tolueno para prevenir a proliferação de microrganismos. A água de diálise foi mudada até atingir condutividade próxima da água destilada (de 3 a 5 mudas dependendo da concentração de KOH da extração).

Na figura 12 encontra-se esquematizado o procedimento descrito para extração dos polissacarídeos da parede celular da levedura *S. pastorianus* inicial e excedentária. A azul encontram-se evidenciados os procedimentos de extração comuns a todas as leveduras (*S. pastorianus* inicial e excedentária, *S. cerevisiae* e *C. albicans*).

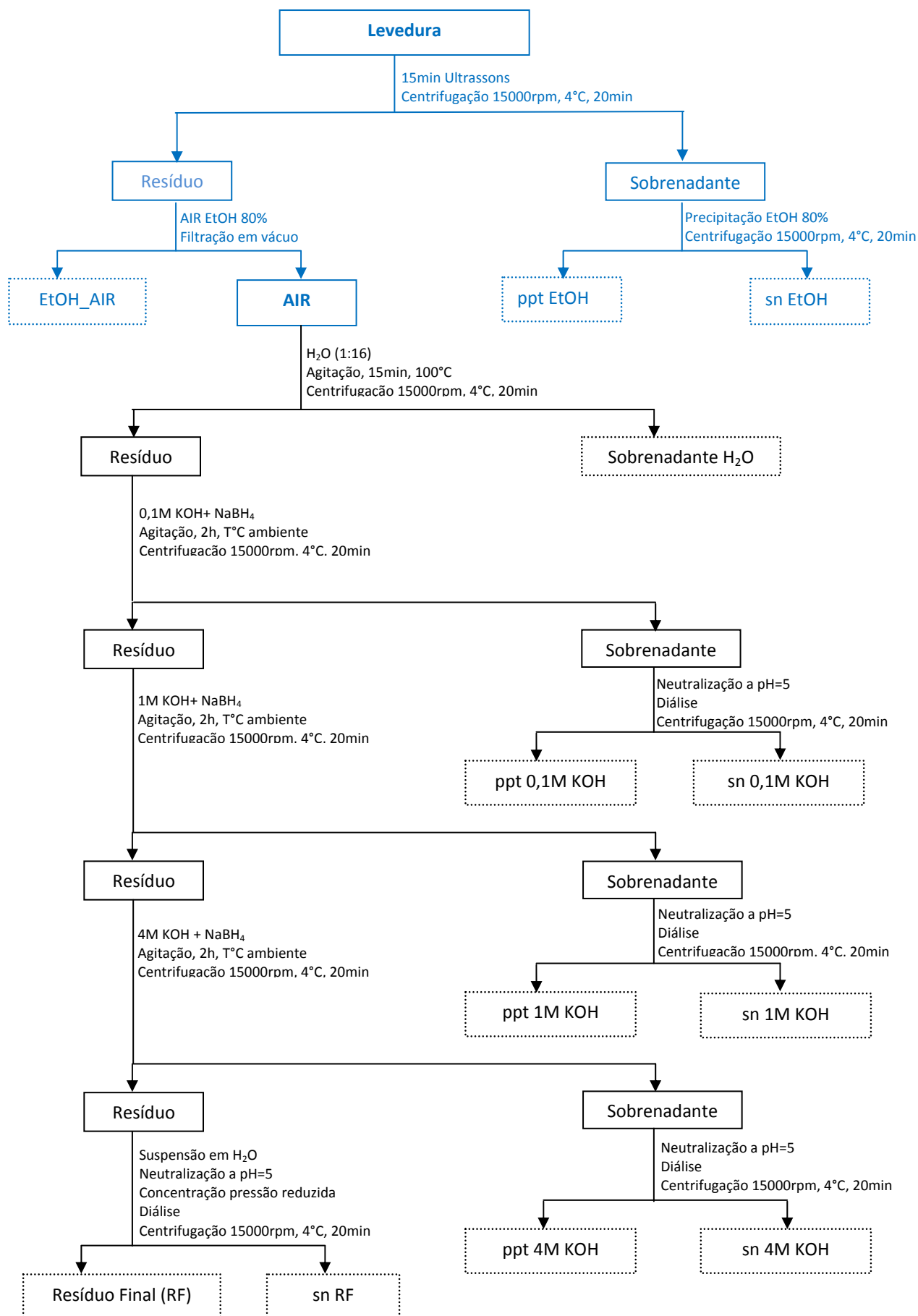


Figura 12: Procedimento de extração de polissacarídeos da levedura cervejeira *Saccharomyces pastorianus*. A azul está destacado o procedimento também realizado para a *S. cerevisiae* e *C. albicans*.

2.4. Análise de açúcares

A análise de açúcares neutros das amostras foi realizada com hidrólise ácida dos polissacarídeos em condições que proporcionam a despolimerização como mínimo de destruição dos resíduos, segundo o método de Selvendran *et al.* [84] Posteriormente, os resíduos são convertidos em acetatos de alditol (AA), derivados voláteis e termoestáveis que possibilitam a análise quantitativa e qualitativa dos resíduos de açúcar por GC-FID [85].

A hidrólise dos polissacarídeos realizou-se em tubos de cultura com 1-2 mg de amostra. À amostra foram adicionados 200 µL de H₂SO₄ 72% (m/m) deixando reagir por 3 h à temperatura ambiente, com agitação esporádica para homogeneização da amostra. De seguida adicionaram-se 2,2 mL de água destilada, perfazendo a concentração do ácido a 1 M, e deixou-se incubar a 100 °C num bloco de aquecimento. Decorrida 1 h de reação retiram-se 0,5 mL de hidrolisado para determinação de ácidos urónicos (ponto 2.5), deixando os 1,9 mL restantes a hidrolisar por mais 1,5 h.

Terminada a hidrólise, arrefeceram-se os tubos num banho de gelo e adicionou-se 200 µL da solução de padrão interno (2-desoxiglucose, 1 mg/mL). De seguida transferiu-se 1 mL de hidrolisado para novos tubos de cultura, neutralizou-se o ácido com 200 µL de NH₃ a 25%. Para redução dos resíduos a acetatos de alditol adicionou-se 100 µL de solução de solução NaBH₄ 15% (m/v) em NH₃ 3 M (preparada na hora). A solução foi agitada e incubada num bloco de aquecimento a 30 °C por 1 h.

Completa a redução, arrefeceram-se os tubos em banho de gelo e o excesso de NaBH₄ foi eliminado por 2 adições sucessivas de 50 µL de ácido acético glacial. De seguida transferiram-se para tubos de Sovirel 300 µL de solução contendo os açúcares reduzidos, e colocaram-se os tubos num banho de gelo. A cada tubo adicionou-se 450 µL do catalisador 1-metilimidazol e 3 mL do reagente acetilante anidrido acético, agitando muito bem e deixando reagir por 30 min num bloco de aquecimento a 30 °C.

Os acetatos de alditol formados foram removidos por extração líquido-líquido com 3 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano. A água destilada foi utilizada para remover o excesso de anidrido acético e o diclorometano para extrair os acetatos de alditol. Após agitação manual vigorosa, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm durante 1 min, e a fase aquosa superior removida por sucção. À fase orgânica adicionaram-se novamente 3

mL de H₂O destilada e 2,5 mL de diclorometano e o processo repetiu-se. De seguida, a fase orgânica foi lavada com duas adições sucessivas de 3 mL de água destilada intercaladas por agitação vigorosa, centrifugação e aspiração de fase aquosa. Na última aspiração a fase aquosa foi completa e cuidadosamente removida, e a fase orgânica contendo os acetatos de alditol foi transferida para tubos de *speedvac*. As amostras foram concentradas até à secura num evaporador centrífugo e lavadas 2 vezes com 1 mL de acetona anidra e concentradas novamente.

Para análise por GC-FID, os acetatos de alditol foram diluídos no volume adequado de acetona anidra (cerca de 50 µL). Foi utilizado um cromatógrafo Perkin Elmer – Clarus 400 com uma coluna capilar DB-225 (30 m comprimento, 0,25 mm de diâmetro, e 0,15 µm espessura) e uma fase estacionária composta por 50% de cianopropilfenil e 50% metilpolisiloxano. O volume de injeção foi de 2 µL, a temperatura do injetor de 220 °C e do detetor a 230 °C. Utilizou-se hidrogénio como gás de arraste à pressão de 17 psi, uma atenuação de 6 e “*split*” de 10 min. Utilizou-se o programa de temperaturas com as seguintes condições: início a 200°C, rampa de 40 °C/min até 220 °C, estabilização a 220 °C durante 7 min, rampa de 20 °C/min até 230 °C, e estabilização a 230 °C durante 1 min.

2.5. Determinação de ácidos urónicos

Os ácidos urónicos (AU) foram quantificados por adaptação do método colorimétrico proposto por Selvendran *et al.* [84]

Para calibração foram preparados 5 padrões a partir de uma solução de ácido galacturónico 200 µg/mL, com concentração 0, 5, 10, 15 e 20 µg/mL.

Aos 0,5 mL de hidrolisado recolhido na análise de açúcares (ver ponto 2.4) adicionou-se 1,5 mL de água destilada. Para cada amostra e padrão foram preparados 3 tubos, 1 branco e duas réplicas, com 500 µL, aos quais foram adicionados 3 mL de ácido bórico 50 mM preparado em H₂SO₄ concentrado. Após agitação manual cuidadosa, o topo dos tubos foi tapado com uma folha de alumínio e os tubos foram colocados a reagir num banho a 100 °C por 10 min. Posteriormente arrefeceram-se os tubos num banho de gelo e foram adicionados no escuro 100 µL de MFF (*m*-fenilfenol 0,15% (m/v) em 0,5% (m/v) de NaOH) a dois dos três tubos de cada amostra (O tubo sem MFF representava o branco de cada amostra/padrão). Os tubos foram agitados manualmente e colocados a reagir no

escuro por 30 min à temperatura ambiente. Decorrido o tempo de reação, agitaram-se os tubos e a absorvância das soluções foi determinada a 520 nm contra o ar.

Ao valor de absorvância das amostras e padrões foi subtraído o valor de absorvância do respetivo branco e a quantidade de ácidos urónicos em cada amostra foi determinada por interpolação gráfica da curva de calibração numa gama de 0 a 20 µg/mL.

2.6. Análise de ligações glicosídicas

A ligação estabelecida entre os resíduos dos polissacarídeos extraídos foi determinada pela análise de acetatos de alditol parcialmente metilados (PMAA), por adaptação do método de Ciucanu e Kerek [86]. A análise de PMAA informa sobre a natureza do resíduo e da ligação e baseia-se na conversão dos grupos hidroxilos livres a éteres metílicos por reação do polissacarídeo dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO), na presença de uma base forte (NaOH), com iodeto de metilo. A posterior hidrólise ácida do polímero expõe os grupos que estavam envolvidos em ligações, os quais são reduzidos e acetilados originando os PMAA. Estes derivados são posteriormente separados e analisados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espetrometria de massa com analisador quadrupolo (GC-qMS).

As amostras foram previamente pesadas, 1-2 mg, para tubos de *speedvac* com septo na tampa e secas em estufa de vazio por 2 h na presença de P₂O₅. Posteriormente, as amostras foram deixadas em agitação durante a noite em 1 mL de DMSO, à temperatura ambiente. Às amostras completamente dissolvidas foram adicionados 40 mg de NaOH em pó, triturado sob atmosfera de árgon imediatamente antes de utilizar, e deixou-se reagir durante 30 min com agitação à temperatura ambiente. De seguida foram adicionados com uma seringa 80 µL de iodeto de metilo, agente metilante, que reagiu por 20 min sob agitação vigorosa à temperatura ambiente. Repetiu-se a adição de iodeto de metilo. Aos éteres metílicos obtidos foram adicionados 3 mL de uma solução de clorofórmio/metanol preparada na proporção de 1:1 em volume. De seguida, as amostras metiladas foram dialisadas em membranas de poro 12-14 kDa contra uma solução de 2 L de etanol/água destilada na proporção de 1:1 em volume. Após 2 mudas da solução de diálise, as amostras foram recolhidas para tubos de *speedvac* e concentradas até à secura no evaporador centrífugo. De seguida, para completa metilação, dissolveram-se novamente as amostras em 1 mL de DMSO com agitação cerca de 30 min (durante o tempo necessário para a

dissolução completa da amostra). Todos os passos de metilação até diálise e concentração no evaporador centrífugo foram de seguida repetidos.

Após remetilação, os ésteres metílicos foram hidrolisados com 500 μL de TFA 2 M durante 1 h num bloco de aquecimento a 121 $^{\circ}\text{C}$ e agitação ocasional. Hidrolisadas as amostras o ácido foi evaporado no evaporador centrífugo. Para redução das amostras hidrolisadas foram adicionados 20 mg de NaBD_4 e 300 μL de NH_3 2 M, agitaram-se os tubos e deixou-se reagir a 30 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 h. O excesso de NaBD_4 foi neutralizado com duas adições sucessivas de 50 μL de ácido acético glacial. A reação de redução, acetilação e a extração líquido-líquido procedeu de igual forma à análise de açúcares (ponto 2.4).

Os PMAA foram dissolvidos no volume adequado de acetona anidra (cerca de 20 a 50 μL) e analisados por GC-qMS. Foi utilizado um cromatógrafo Agilent Technologies 6890N Network com uma coluna capilar apolar DB-1 (30 m comprimento, 0,25 mm de diâmetro, e 0,15 μm espessura), composta por dimetilpolisiloxano. O volume de injeção foi de 0,2 μL , a temperatura do injetor de 220 $^{\circ}\text{C}$ em modo “*split*” de 5 min, e utilizou-se hélio como gás de arraste. Utilizou-se um programa de temperaturas com as seguintes condições: 40 min de tempo total, temperatura inicial de 50 $^{\circ}\text{C}$, rampa de 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 140 $^{\circ}\text{C}$, isotérmica a 140 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min, rampa de 0,5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 150 $^{\circ}\text{C}$, rampa de 40 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 280 $^{\circ}\text{C}$ e isotérmica a 280 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 min.

2.7. Tratamento enzimático com celulase e α -amilase

Os polissacarídeos das frações do AIR das leveduras *S. cerevisiae* e *C. albicans*, do snRF e do RF das leveduras *S. pastorianus* foram seletivamente hidrolisados com uma celulase de *Aspergillus niger* (EC 3.2.1.4, Fluka BioChemika) e uma α -amilase de *Bacillus subtilis* (EC 3.2.1.1, Fluka BioChemika) que atuam nas ligações glicosídicas β - e α -(1 \rightarrow 4)-Glc, respetivamente. O processo de hidrólise baseou-se no trabalho desenvolvido por Dikit *et al.* [87].

A hidrólise das ligações β -(1 \rightarrow 4)-Glc de 10 mg de amostra em 5 mL de tampão acetato 20 mM com pH 5,0 foi promovida pela celulase de *Aspergillus niger* 1,5 U/mg numa reação de 4 h decorrida a 37 $^{\circ}\text{C}$. Como controlos positivo e negativo para a reação foram utilizadas 10 mg de papel higiénico (celulose) e 10 mg de amilose em pó, em substituição da amostra.

A hidrólise das ligações α -(1 \rightarrow 4)-Glc de 10 mg de amostra em 5 mL de tampão fosfato 50 mM com pH 7,0 foi promovida pela α -amilase de *Bacillus subtilis* 62 U/mg numa reação de 2 h decorrida a 25 °C. Como controlo positivo e negativo para a reação foram utilizadas 10 mg de amilose em pó e 10 mg de papel higiénico (celulose) em substituição da amostra.

Decorrido o tempo de reação das hidrólises, as enzimas foram inativadas colocando os tubos num banho a 100 °C durante 10 min. Posteriormente as amostras e controlos hidrolisados foram dialisados em membranas de poro 12-14 kDa contra água a 4 °C. Terminada a diálise as amostras foram liofilizadas e analisadas as ligações glicosídicas por metilação (ponto 2.6).

2.8. Análise de aminoácidos

O conteúdo em aminoácidos totais das frações AIR de *C. albicans* foi determinado por adaptação dos métodos de Zumwalt *et al.* [88] para a hidrólise ácida do conteúdo proteico e Mackenzie *et al.* [89] para derivatização dos aminoácidos para análise por GC-FID.

A 5 mg de amostra pesada para tubos de *speedvac* foi adicionado 1 mL de HCl 6 M. Os tubos sujeitos a atmosfera de azoto foram fechados e a reação de hidrólise ácida decorreu por 24 h a 110 °C num bloco de aquecimento. Arrefecidos os tubos, foram adicionados ao hidrolisado 500 μ L de solução de norleucina 5,0 mM em HCl 0,1 M como padrão interno. O conteúdo dos tubos foi concentrado até à secura no evaporador centrífugo e dissolvido de seguida em 1 mL de HCl 0,1 M. A solução foi filtrada com filtros de 45 μ m e novamente concentrada até à secura no evaporador centrífugo.

Os aminoácidos libertados pela hidrólise foram dissolvidos em 200 μ L de isobutanol em 3 M HCl deixando reagir durante 10 min a 120 °C. Após agitação no vórtex a reação prosseguiu por mais 30 min a 120 °C no bloco de aquecimento. Arrefecidos os tubos num banho de gelo, o excesso de reagente foi evaporado no evaporador centrífugo. De seguida foi adicionado 200 μ L de BHT preparado em acetato de etilo, e o solvente foi novamente evaporado por completo. Por fim foram adicionados 100 μ L de anidrido heptafluorobutírico e deixou-se reagir durante 10 min a 150 °C. Terminada a reação, e arrefecidos os tubos, o excesso de reagente foi evaporado no evaporador centrífugo.

O material resultante foi dissolvido em 50 µL de acetato de etilo anidro e analisados por GC-FID. Foi utilizado um cromatógrafo Perkin Elmer – Clarus 400 com uma coluna capilar DB-1 (30 m comprimento, 0,25 mm de diâmetro, e 0,15 µm espessura) e uma fase estacionária composta por dimetilpolisiloxano. O volume de injeção foi de 2 µL, a temperatura do injetor de 250 °C e do detetor a 260°C. Utilizou-se hidrogénio como gás de arraste e utilizou-se o programa de temperaturas com as seguintes condições: início a 70°C estabilização durante 1 min, rampa de 2°C/min até 170 °C, rampa de 16 °C/min até 250 °C, e estabilização a 250 °C durante 5 min.

2.9.Deteção de fosfato por RMN de sólidos

Os espectros de RMN estado sólido 1D de ³¹P das amostras foram adquiridos num espectrómetro Bruker Avance III a operar à frequência de 400 MHz. Foi realizada uma experiência HPDEC (Impulso único com desacoplamento de alta potência) nas seguintes condições:

Impulsos: 90°
Tempo entre scans: 60 s
PCPD2: 6,5 µs
PC12: 4,8 dB
P1: 3 µs
PL1: 10 dB
Ângulo de rotação: 90°

2.10. Estudo da atividade imunoestimuladora

Para investigar a potencial atividade imunoestimuladora de manoproteínas e glucanas da levedura excedentária foram realizados ensaios de ativação de células B em células esplénicas de ratinho.

Foi preparada uma suspensão de células esplénicas de ratinhos por homogeneização do baço em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado com antibióticos e soro bovino. Numa câmara de fluxo laminar foram adicionados 100 µL de células esplénicas a uma placa de cultura ELISA de 96 poços (10⁶ células/poço). De seguida foram adicionados em duplicado 50 µL de RPMI (controlo negativo), 2 µL de LPS em 48 µL de

RPMI (controle positivo), e 50 μ L de amostras com concentração de açúcares entre os 3,5 e os 85 μ g/mL. O volume final de todos os poços foi completado a 200 μ L por adição de 50 μ L de meio RPMI. As células foram incubadas com as amostras durante 17 h numa estufa a 37 °C com atmosfera humidificada e CO₂ controlado (5 %). Decorrida a incubação, a placa foi centrifugada e o sobrenadante descartado.

Para detetar as células ativas por citometria de fluxo foi necessário marcar previamente as células com anticorpos associados a fluorocromos. Dependendo do tipo de células foram preparadas soluções de diferentes anticorpos em tampão Fluorescence-activated cell sorting (FACS) para coloração da superfície. Para marcar linfócitos B foram adicionados anticorpos monoclonais anti-B220 e para avaliar a ativação de células adicionou-se anti-CD69, um marcador precoce de ativação.

A cada poço da placa ELISA foram adicionados 25 μ L das 2 soluções de marcadores. Após 20 min de incubação no escuro à temperatura ambiente foram adicionados aos poços 150 μ L de tampão FACS. Após centrifugação da placa a 15000 rpm durante 7 min o sobrenadante contendo células mortas e anticorpos que não reagiram foi descartado. Às células foram adicionados 25 μ L do fluorocromo PE-Cy5 que liga ao marcador anti-CD69. Após incubação durante 15 min, suspenderam-se as células marcadas em 150 μ L de tampão FACS, e o conteúdo de cada poço foi transferido com cuidado para tubos de citómetro, aos quais foram por fim adicionados 600 μ L de tampão FACS, e feita análise por citometria de fluxo.

Esta análise foi realizada no ICBAS, no laboratório de imunologia em colaboração com o Professor Manuel Vilanova.

3. Resultados e Discussão

3.1. *Saccharomyces pastorianus*

3.1.1. Extração sequencial de polissacarídeos

Com o intuito de extrair e caracterizar os polissacarídeos da parede celular da levedura cervejeira *Saccharomyces pastorianus* realizou-se um procedimento de extração sequencial que envolveu radiação por ultrassons, preparação do AIR, extração com água quente e com soluções alcalinas de concentração crescente. A proporção e composição de hidratos de carbono solubilizados a cada passo de extração para a levedura do inóculo inicial (LIn- não sujeita a processo cervejeiro) e levedura excedentária (LEx- sujeita de 3 a 7 ciclos fermentativos) encontram-se descritas nas tabelas 1 e 2, respetivamente. As análises de açúcares foram realizadas em triplicado e nas tabelas estão representados os valores médios.

Tabela 1: Frações, rendimentos, percentagem molar e concentração de hidratos de carbono (HC) extraídos sequencialmente da levedura *Saccharomyces pastorianus* do inóculo inicial (LIn).

Fração	η massa (%)	η HC extraídos (%)	Hidratos de Carbono (% mol)										Total HC (µg/mg)
			dRib	Rha	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	AU		
LIn	-	-	1	-	2	1	1	33	-	60	1	555	
sn_EtOH_US	9,9	4,8	1	-	0	3	4	2	-	88	3	267	
ppt_EtOH_US	10,2	11,7	1	-	1	3	4	15	1	74	2	635	
EtOH_AIR	5,6	1,1	5	1	2	1	3	2	-	81	4	110	
AIR	59,3	40,7	1		6	-	-	45	-	45	2	381	
sn_H2O 100°C	4,1 (6,9) ¹	2,8 (6,8) ¹	2	-	13	1	1	50	-	30	2	374	
sn_0,1M KOH	2,3 (3,9) ¹	2,0 (5,0) ¹	2	-	20	1	1	67	-	5	3	487	
ppt_0,1M KOH	3,1 (5,2) ¹	0,6 (1,5) ¹	5	-	70	-	-	18	-	3	3	111	
sn_1M KOH	1,3 (2,1) ¹	1,1 (2,8) ¹	1	-	1	2	2	81	-	10	2	500	
ppt_1M KOH	1,9 (3,2) ¹	0,3 (0,6) ¹	12	-	1	4	2	26	-	51	3	74	
sn_4M KOH	2,9 (4,9) ¹	3,7 (9,2) ¹	1	-	1	1	2	83	-	9	4	712	
ppt_4M KOH	2,4 (4,0) ¹	0,8 (2,1) ¹	4	-	-	1	1	8	-	82	3	197	
sn_RF	1,8 (3,0) ¹	2,3 (5,7) ¹	-	-	-	-	-	66	-	30	3	726	
RF	17,2 (29,1) ¹	15,9 (39,0) ¹	-	-	-	-	-	6	-	91	2	511	

1- Valores em função do AIR

Tabela 2: Frações, rendimentos, percentagem molar e concentração de hidratos de carbono (HC) extraídos sequencialmente da levedura *Saccharomyces pastorianus* excedentária (LEx).

Fração	η massa (%)	η HC extraídos (%)	Hidratos de Carbono (% mol)									Total HC ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
			dRib	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	AU	
LEx	-	-	2	-	2	1	1	19	-	70	5	469
sn_EtOH_US	11,8	6,6	4	1	-	2	3	1	-	86	7	262
ppt_EtOH_US	8,7	11,3	2	-	-	2	3	3	-	82	6	607
EtOH_AIR	5,9	8,0	8	2	-	2	3	2	-	72	9	638
AIR	57,0	62,7	1	-	3	1	-	26	-	64	5	511
sn_H ₂ O _{100°C}	4,1 (7,7) ¹	3,4 (5,9) ¹	1	-	8	1	1	45	-	38	6	392
sn_0,1M KOH	2,6 (4,8) ¹	1,5 (2,6) ¹	3	1	35	1	-	50	-	8	3	276
ppt_0,1M KOH	2,1 (4,0) ¹	0,3 (0,5) ¹	12	4	39	-	-	22	-	10	14	63
sn_1M KOH	1,9 (3,5) ¹	1,9 (3,3) ¹	3	1	1	1	-	81	-	9	4	474
ppt_1M KOH	1,5 (2,8) ¹	0,2 (0,4) ¹	16	5			-	30	-	42	7	69
sn_4M KOH	4,4 (8,2) ¹	5,8 (10,0) ¹	2	1	1	1	-	82	-	9	4	624
ppt_4M KOH	2,0 (3,7) ¹	0,3 (0,5) ¹	23	5	-	-	-	46	-	26	1	70
sn_RF	1,3 (2,4) ¹	2,1 (3,6) ¹	2	-	1	1	-	52	-	41	3	756
RF	23,1 (43,0)¹	33,6 (57,4)¹	-	-	-	-	-	4	-	92	4	681

1- Valores em função do AIR

A LIn e LEx apresentam teores de humidade idênticos, com 84,6 e 83,8 %, com consequente percentagem de sólidos de 15,4 e 16,2 %, respetivamente. A LIn é constituída em 56 % por hidratos de carbono, dos quais 60% glucose e 33 % manose. A LEx apresenta uma quantidade inferior de carboidratos de apenas 47 % distribuídos maioritariamente em 70 % de glucose e 19 % de manose. Quantidades reduzidas de desoxirribose, ribose, fucose e ácidos urónicos são encontrados na LIn e LEx.

A presença maioritária de glucose e em menor quantidade manose observada na *S. pastorianus* encontra-se de acordo com o descrito para as leveduras do género *Saccharomyces* [21]. Estes açúcares representam os constituintes dos polissacarídeos maioritários da parede celular da levedura, as glucanas e manoproteínas respetivamente.

O tratamento inicial da *S. pastorianus* com radiação ultrassónica por 15 min permitiu a extração de açúcares solúveis como oligossacarídeos e polissacarídeos intracelulares. Os ultrassons ao desestabilizarem estruturas rígidas como a parede celular da levedura

aumentam a permeabilidade e a consequente libertação de conteúdo intracelular. Na extração com ultrassons solubilizaram-se 13 % dos carboidratos da LIn e 19 % da LEx (sn_EtOH_US + ppt_EtOH_US). Os polímeros que precipitaram em etanol são compostos maioritariamente por glucose, entre 74 e 82 % mol, provavelmente provenientes de glicogénio intracelular.

A partir dos resíduos obtidos da extração com ultrassons foram preparados os AIRs. A preparação dos AIRs revela-se uma técnica simples e rápida para isolar as paredes celulares da levedura compostas por polímeros insolúveis em álcool. Comparando a LIn e a LEx, verifica-se uma diferença significativa entre o teor de total de açúcares do AIR, com 381 e 511 µg de açúcares/mg de amostra, respetivamente. Com a preparação do AIR da LIn obteve-se um rendimento de extração de açúcares de 41 % contendo apenas 381 µg de açúcares/mg de amostra. Em contrapartida, na preparação do AIR da LEx obteve-se um rendimento de extração em açúcares superior, com 62 % e um total de carboidratos de 511 µg/mg de amostra. A presença de uma quantidade inferior de hidratos de carbono no AIR da LIn poderá indicar a presença de uma quantidade superior de proteína e de ácidos nucleicos. No entanto a hidrólise no AIR da LIn poderá não ter sido completa por difícil solubilização do AIR no ácido, podendo o total de açúcares da fração estar subestimado.

A extração com água quente permitiu solubilizar 8,2 % de polissacarídeos do AIR da LIn, numa fração composta por 50 % molar de manose, 30 % molar de glucose e 13 % molar de ribose. Do AIR da LEx solubilizaram-se 5,9 % de polissacarídeos com água quente, nomeadamente 45% molar de manose, 38% molar de glucose, e 8 % molar de ribose. O perfil de extração com água quente foi similar para ambas as leveduras, obtendo frações com aproximadamente 40 % de açúcares totais. A ribose é uma pentose constituinte das coenzimas nucleotídicas e do ácido ribonucleico (RNA). Como a presença de ribose na parede celular de levedura apenas está descrita em reduzida quantidade para o fungo *Ustilago maydis* [90], o mais provável é que esta seja constituinte do RNA.

Na extração alcalina com 0,1 M KOH obteve-se um rendimento de solubilização de açúcares de 6,5 e 3,1 % para a LIn e LEx, respetivamente. No entanto, foi com 0,1 M KOH que se conseguiu extrair a maior percentagem molar de ribose, com um máximo de 70 % molar para o ppt_0,1M KOH da LIn.

Durante a extração com 1 M KOH solubilizou-se uma fração muito rica em manoproteínas, com 81% molar de manose e um rendimento de extração em

polissacarídeos do AIR de aproximadamente 2,8-3,3 % para ambas as leveduras. Na extração com 4 M KOH o rendimento de polissacarídeos extraídos do AIR foi aproximadamente 3 vezes superior do que para a extração com 1 M KOH, com aproximadamente 11 % para ambas as leveduras. A extração com 4 M KOH revelou-se a mais eficiente na solubilização das manoproteínas da parede celular, com extração de 17 % e 32 % molar da manose existente no AIR da LIn e LEx, respetivamente. A fração sn_4M KOH é bastante rica em açúcares (62-71%), com percentagem molar de manose de 82-83 %.

Das extrações alcalinas realizadas é possível verificar que se extraem essencialmente as manoproteínas da parede celular da levedura. Verifica-se ainda que para uma concentração crescente de base, o teor de manoproteínas solubilizadas e a proporção em hidratos de carbono nas frações aumentam.

Do material não solubilizado nas extrações alcalinas, após diálise e centrifugação foi possível separar um resíduo final e um sobrenadante do resíduo final. O sobrenadante do resíduo final representa a fração mais rica em açúcares (73-76%) com 65 % mol de manose e 30 % mol de glucose na LIn, 52% mol de manose e 41 % mol de glucose na LEx.

Para averiguar a presença de manosilfosfatos nas cadeias de manoproteínas extraídas no sn_4M KOH e snRF, analisou-se a LEx por RMN 31P de estado sólido com experiência em HPDEC. Pela análise dos espetros presentes na figura 13 é possível verificar a presença de um pico entre os -10 e 10 ppm que engloba fosfatos em ligação fosfodiéster. Para além dos açúcares, os ácidos nucleicos também apresentam ligações fosfodiéster, contudo, a sua presença nas frações analisadas é diminuta (< 2% molar) pelo que a sua contribuição para a intensidade do sinal também será. O sinal mais intenso para o sn_4M KOH pode assim justifica-se pelo teor superior de manose nesta fração. A presença dos manosilfosfatos nas manoproteínas confere carga negativa à superfície celular relevante para a proteção da parede celular [39].

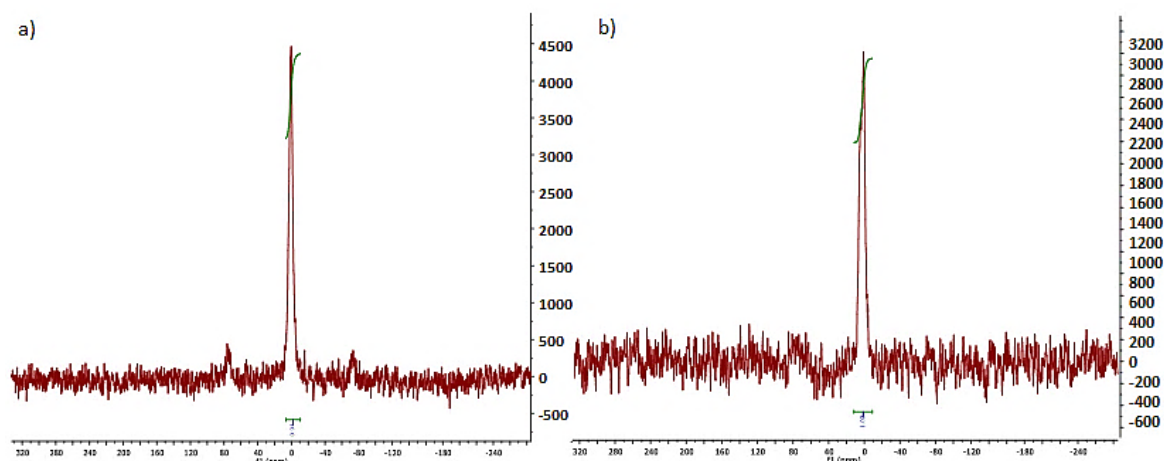


Figura 13: Espectros de RMN 31P do sn_4M KOH (a) e snRF (b) da LEx.

Apesar de similar, o perfil de extração de polissacarídeos em ambas as leveduras *S. pastorianus*, o resíduo final na LEx contém um teor superior de hidratos de carbono por solubilizar. Na LEx ficaram por extrair 57 % dos polissacarídeos do AIR, numa fração composta por 681 µg de açúcares por mg de amostra e 90 % mol de glucanas. O resíduo final da LIn contém 47 % dos polissacarídeos do AIR, num total de 511 µg/mg e 89 % mol de glucanas. As glucanas presentes no resíduo final são as β -glucanas resistentes a extração alcalinas, constituintes da camada interna da parede celular da levedura.

Com a realização da extração sequencial dos polissacarídeos da parede celular da *S. pastorianus* é possível verificar que as condições alcalinas utilizadas extraem essencialmente manoproteínas (Figura 14). A partir do AIR, são extraídas 46 % das manoproteínas da LIn e 66 % da LEx, ficando por solubilizar no RF 5,3 % e 7,8 % respetivamente. Estes resultados evidenciam uma perda durante as extrações, possivelmente na diálise, de 48 % e 27 % das manoproteínas do AIR da LIn e LEx. As manoproteínas do tipo O, por exemplo, como cadeias curtas de mananas com baixa massa molecular, poderão estar a sair pela membrana de diálise. Do AIR da LIn apenas são extraídas 16 % de glucanas ficando por solubilizar no resíduo 76 %. A extração de glucanas do AIR da LEx teve um rendimento de apenas 9%, aproximadamente metade da LIn, obtendo-se um RF composto por 84% das glucanas da parede.

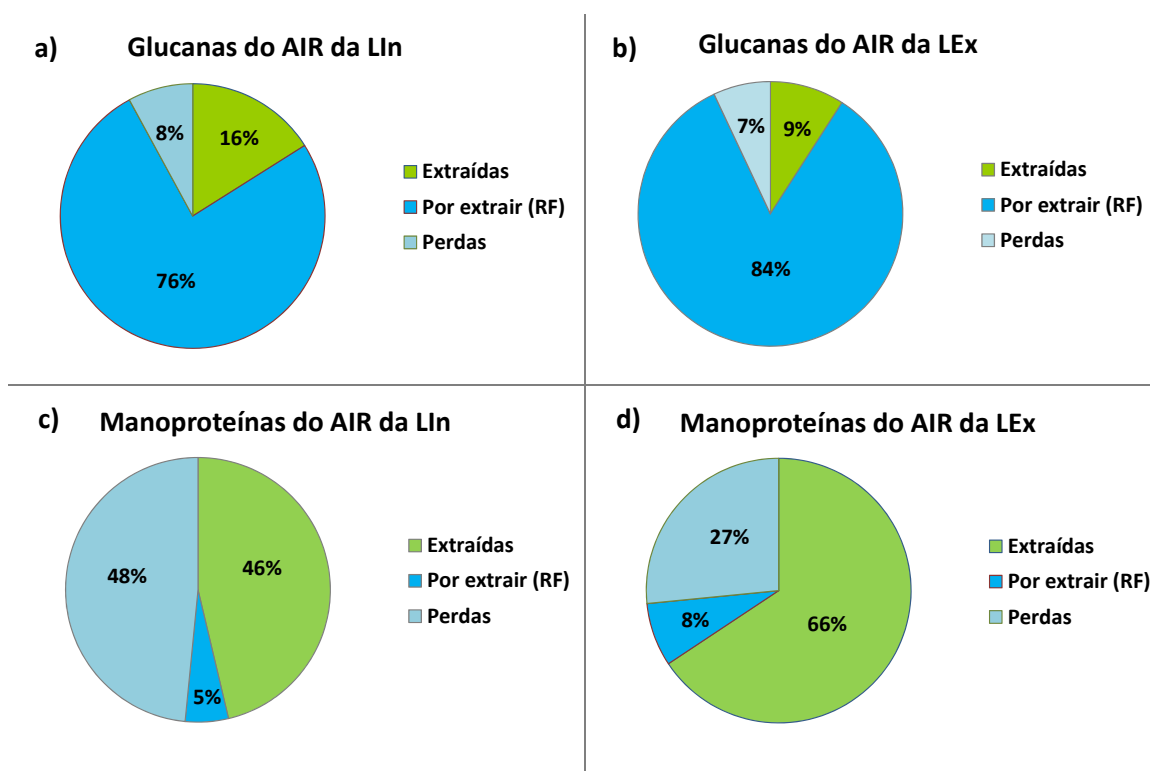


Figura 14: Rendimentos de extração (%) a partir do AIR de **a)** glucanas da LIn, **b)** manoproteínas da LIn, **b)** glucanas da LEx e **d)** manoproteínas da LEx.

3.1.2. Análise de Ligações Glicosídicas

Para inferir o tipo de ligações glicosídicas obtido na extração sequencial foi realizada uma análise de metilação a algumas frações permitindo traçar o perfil de extração. Assim, foi realizada análise de metilação às leveduras, ao precipitado com etanol do sobrenadante do US (ppt_US), AIR, sobrenadante da extração com água quente (sn_H₂O_{100°C}) e 4 M de KOH (sn_4M KOH), sobrenadante do resíduo final (sn_RF) e resíduo final (RF). As ligações glicosídicas da LIn e da LEx estão descritas na tabela 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3: Ligações glicosídicas de frações da extração sequencial do inóculo de *S. pastorianus* (LIn). (Entre parêntesis encontram-se os valores da análise de açúcares determinadas por GC-FID.)

Ligação Glicosídica	Fração (%mol)						
	LIn	ppt_US	AIR	sn_H ₂ O _{100°C}	sn_4M KOH	sn_RF	RF
t-Ara	1,2	5,2	0,4	0,5	-	-	-
Total	1,2 (1)	5,2 (4)	0,4 (0)	0,5 (1)	-	-	-
4-Xyl	1,1	3,3	0,5	0,3	-	-	-
Total	1,1 (1)	3,3 (3)	0,5 (0)	0,3 (1)	-	-	-
t-Man	16,9	6,5	13,5	17,9	39,0	23,3	3,6
2-Man	10,5	3,3	10,1	14,6	19,0	14,6	3,9
3-Man	4,0	-	4,0	6,4	10,1	8,2	-
4-Man	-	-	0,4	-	v	0,3	-
6-Man	1,3	0,4	1,3	0,9	1,8	1,3	1,0
2,6-Man	12,6	3,9	11,6	18,1	13,1	22,1	3,5
3,6-Man	-	-	1,3	0,5	1,2	0,5	-
2,3,6:2,4,6-Man	-	-	-	-	0,5	0,7	-
2,3,4,6-Man	0,3	3,0	14,3	3,4	0,4	0,5	0,3
Total	45,6 (33)	17,1 (15)	56,5 (45)	61,8 (50)	85,1 (83)	71,5 (65)	12,3 (6)
t-Glc	9,8	15,5	2,8	1,7	1,3	2,6	8,6
3-Glc	7,8	0,2	10,8	1,1	1,4	0,5	41,8
4-Glc	21,0	44,4	9,3	7,7	8,0	21,1	15,9
6-Glc	4,0	0,7	3,1	0,4	0,7	0,4	11,3
2,3-Glc	0,4	-	0,9	-	-	-	0,7
3,4-Glc	0,1	-	0,4	-	-	-	0,2
3,6-Glc	0,6	-	1,2	-	-	-	3,3
4,6-Glc	3,7	10,5	1,4	1,1	0,8	2,3	1,2
2,3,4,6-Glc	1,9	3,1	11,3	25,2	1,5	1,2	3,4
Total	49,3 (60)	74,4 (74)	41,2 (45)	37,2 (30)	13,7 (9)	28,2 (30)	86,4 (89)
4-GlcNAc	0,1	-	0,8	0,4	0,9	0,1	1,1
Total	0,1 (n.d.)	-	0,8 (n.d.)	0,4 (n.d.)	0,9 (n.d.)	0,1 (n.d.)	1,1 (n.d.)

n.d. – não determinado na análise de açúcares, v- quantidades vestigiais

Tabela 4: Ligações glicosídicas de frações da extração sequencial de *S. pastorianus* excedentária (LEx). (Entre parêntesis encontram-se os valores da análise de açúcares determinados por GC-FID.)

Ligação Glicosídica	Fra�o (%mol)						
	LEx	ppt_US	AIR	sn_H ₂ O _{100�C}	sn_4M KOH	sn_RF	RF
t-Ara	0,9	2,1	0,6	-	0,1	-	-
Total	0,9 (1)	2,1 (2)	0,6 (1)	-	0,1 (1)	-	-
4-Xyl	1,7	2,1	1,5	6,1	0,3	-	-
Total	1,7 (2)	2,1 (3)	1,5 (0)	6,1 (1)	0,3 (0)	-	-
t-Man	4,7	0,4	8,7	15,1	29,6	21,1	2,4
2-Man	4,5	0,2	5,8	10,8	20,0	13,1	1,2
3-Man	-	-	-	-	7,4	4,3	-
4-Man	-	-	-	0,9	0,4	0,5	-
6-Man	1,3	0,4	1,2	1,1	2,2	1,2	v
2,6-Man	6,8	2,1	9,4	12,6	29,5	13,4	2,5
3,6-Man	-	-	0,8	1,0	0,7	-	-
2,3,6:2,4,6-Man	-	-	-	-	0,6	0,6	-
2,3,4,6-Man	4,9	0,1	1,5	2,2	0,4	1,3	0,9
Total	22,3 (11)	3,1 (3)	28,0 (26)	43,6 (45)	90,7 (82)	55,6 (52)	7,0 (4)
t-Glc	4,2	16,9	6,9	4,9	0,5	5,4	10
3-Glc	2,1	1,0	6,7	1,7	0,2	0,8	17,3
4-Glc	22,6	56,3	38,0	30,3	6,6	27,1	42,7
6-Glc	2,2	1,5	5,8	1,9	0,6	1,2	9,3
2,3-Glc	-	-	0,8	v	-	-	1
3,4-Glc	-	-	0,5	v	-	-	0,4
3,6-Glc	-	-	1,0	v	-	-	2,2
4,6-Glc	5,2	16,7	3,8	3,5	-	1,7	5,4
2,3,4,6-Glc	33,6	0,2	4,6	5,5	0,8	6,6	3,7
Total	70,0 (75)	92,6 (82)	68,2 (64)	47,7 (38)	8,7 (9)	42,9 (41)	92,0 (90)
4-GlcNAc	0,9	-	1,5	1,3	0,1	0,6	0,5
Total	0,9 (n.d.)	-	1,5 (n.d.)	1,3 (n.d.)	0,1 (n.d.)	0,6 (n.d.)	0,5 (n.d.)

n.d. – não determinado na análise de a  ares, **v**- quantidades vestigiais

Pela análise de ligações glicosídicas da LIn, LEx e frações extraídas verifica-se uma concordância geral com a análise de a  ares neutros nos teores globais e tipos de a  ares presentes. Pela análise de metilação foi possível identificar quantidades reduzidas de (1  4)-GlcNAc, proveniente da âncora das manoproteínas do tipo *N* e/ou da quitina da

parede celular. Como esta ligação é mais fácil de hidrolisar quando a GlcNAc se encontra metilada, é visível na análise de metilação mas não é na análise de açúcares.

Os carboidratos da LIn e da LEx são majoritariamente constituídos por (1→4)-Glc, com uma percentagem molar de 21 e 23 % respetivamente. A glucose em ligação (1→4) pode ter origem na glucose intracelular oriunda da *pool* citosólica de glicogénio solúvel e glucose da *pool* insolúvel da parede celular [22]. No caso da LEx, apesar da levedura ser filtrada após sedimentação natural, parte da glucose em ligação (1→4) observada pode também advir de alguma contaminação da amostra com dextrinas do processo cervejeiro. Na LEx foi observado um teor de glucitol (2,3,4,6-Glc) elevado, cerca de 34 %, representativo de resíduos de glucose não metilados. A ausência de metilação pode indicar falta de acessibilidade do reagente metilante CH₃I aos açúcares ou submetilação de resíduos muito ramificados. É possível que uma baixa solubilização da levedura em DMSO e a presença de uma parede celular organizada em camadas dificulte a reação de metilação, em especial das glucanas que constituem a camada interna.

A exposição da levedura aos ultrassons, ao destabilizar a estrutura da parede celular permitiu a extração de açúcares intracelulares solúveis. Esta fração na LEx é rica em glucanas (93%) com 56 % de glucose em ligação (1→4) ramificada com 17 % de glucose em ligação (1→4,6) e glucose em ligação terminal, característico do glicogénio. Na LIn foi solubilizada uma quantidade inferior de glucose em ligação (1→4), cerca de 44 %, com 11 % de glucose ramificada em (1→4,6) e 16 % de terminais. O ultrassons revelou-se uma técnica rápida e simples para promover autólise da levedura com remoção de conteúdo intracelular, em particular glicogénio citosólico.

O AIR, composto pelas paredes celulares, apresenta um teor superior de glucanas na LEx, em particular 38 % de glucanas em ligação (1→4) pouco ramificadas com 3,8 % de glucose em ligação (1→4,6) e 6,9 % de terminais. Comparativamente, o AIR da LIn apresenta uma menor percentagem de glucose em ligação (1→4), de apenas 9%, com 1,4 % de glucose em ligação (1→4,6) e 2,8 % de glucose terminal. Esta fração possui proporções idênticas de manose e glucose, com 11 % da glucose em ligação (1→3) e 10 % de manose em ligação (1→2). A razão de ramificações de manose em ligação (1→2,6) e (1→3,6) com a manose em ligação (1→6) indica presença de 10 resíduos ramificados por cada resíduo de manose sem ramificação no AIR da LIn, e de 9 no AIR da LEx. Em conjunto com a presença de manose terminal em proporção similar à manose ramificada,

concluiu-se que as mananas dos AIR da LIn e LEx são polímeros bastante ramificados através de manose em ligação (1→2,6). De ressaltar a presença de um teor elevado de manitol (2,3,4,6-Man) e glucitol (2,3,4,6-Glc) para o AIR da LIn provavelmente resultante da submetilação destes açúcares.

Na extração com água quente obteve-se um extrato com quantidades equivalentes de mananas e glucanas na LEx. Tal como verificado no AIR, o teor de glucose em ligação (1→4) na LEx é elevado, cerca de 30 %, comparativamente à LIn com apenas 9 %. Em ambas as leveduras manoproteínas solubilizadas são compostas por cadeias de manose em ligação (1→6) muito ramificadas em (1→2,6) com manose em ligação (1→2) e (1→3), existindo na LIn e na LEx 21 e 13 resíduos de manose ramificados por cada manose em ligação (1→6), respetivamente. Estas ligações são características de manoproteínas do tipo N [37].

Na extração com 4 M KOH foram extraídas manoproteínas com conteúdo superior de terminais (39 % na LIn e 30 % na LEx), e manose em ligação (1→2) e (1→3). A presença de ramificação em (1→2,6)-manose sugere a extração de manoproteínas do tipo N, contudo em maior quantidade na LEx (91 %). Tal como verificado na análise de açúcares, foi com 4 M KOH que se extraiu maior conteúdo de manoproteínas.

No sobrenadante do resíduo final foi possível solubilizar quase a totalidade da manose ainda existente após a extração com 4M de KOH, para ambas as leveduras LIn e LEx, sendo constituído por 72 % e 56 mol%, respetivamente. O resíduo resultante contém apenas 12 % mol de manose para a LIn e 7 mol% para a LEx. O resíduo final de ambas as leveduras destaca-se pela elevada quantidade de glucose. Na LIn o resíduo é constituído por 86 % de glucose com 42, 16 e 11 % em ligação (1→3), (1→4) e (1→6) respetivamente. O RF da LEx é composto por 92 % de glucose, da qual cerca de metade, 43 % está em ligação (1→4). As β -(1→3) e β -(1→6) glucanas constituem 17 % e 9 % do RF. Em ambas as leveduras a percentagem de glucose em ligação β -(1→3) no RF é superior à glucose em ligação β -(1→6), resultado que corrobora a presença de glucanas β -(1→3) como glucanas maioritária na parede celular da levedura. É notório que durante a utilização da levedura no processo cervejeiro existe um incremento da glucose em ligação (1→4) em detrimento da glucose em ligação (1→3). É possível que a parede celular da levedura sofra alteração na composição das glucanas com a reutilização e com o *stress* associado ao processo fermentativo. A presença no RF da LIn e da LEx de diferentes

teores de glucose insolúvel, em ligação (1→4) ramificada em (1→4,6), é consistente com a possível presença de glicogénio insolúvel reportado na parede celular de *S. cerevisiae* [91].

3.1.3. Configuração anomérica de 1-4 Glc

Para averiguar a conformação anomérica dos resíduos de glucose em ligação (1→4) o snRF e o RF das leveduras LIn e LEx foram tratados enzimaticamente com uma α -amilase e uma celulase. O perfil das ligações glicosídicas do snRF e o RF antes e após hidrólise enzimática com cada enzima encontra-se compilado na tabela 5 para a LIn e tabela 6 para a LEx.

Tabela 5: Ligações glicosídicas do snRF e RF da LIn com e sem hidrólise enzimática.

Ligação Glicosídica	Fração (% mol)					
	snRF *	snRF amilase	snRF celulase	RF *	RF amilase	RF celulase
t-Man	23,3	27,7	26,0	3,6	3,2	3,0
2-Man	14,6	18,3	14,8	3,9	1,5	-
3-Man	8,2	9,3	9,1	-	1,0	1,0
4-Man	0,3	0,2	0,4	-	-	-
6-Man	1,3	1,8	1,1	1,0	0,5	-
2,6-Man	22,1	27,7	18,5	3,5	2,6	2,6
3,6-Man	0,5	0,7	0,5	-	1,0	-
2,3,6-Man: 2,4,6-Man	0,7	0,6	0,3	-	0,5	0,8
2,3,4,6-Man	0,5	0,2	0,1	0,3	0,5	0,4
Total	71,5 (65)	86,5	70,8	12,3 (6)	10,8	7,8
t-Glc	2,6	2,0	3,5	8,6	7,6	7,3
3-Glc	0,5	0,3	0,3	41,8	48,7	43,5
4-Glc	21,1	7,3	20,3	15,9	5,3	11,0
6-Glc	0,4	0,5	0,5	11,3	11,5	11,1
2,3-Glc	-	-	-	0,7	3,2	3,9
3,4-Glc	0,1	0,1	-	0,2	0,5	1,2
3,6-Glc	-	-	-	3,3	1,0	6,4
4,6-Glc	2,3	2,1	3,3	1,2	1,2	2,3
2,3,4,6-Glc	1,2	0,5	0,8	3,4	3,8	4,0
Total	28,2 (30)	12,8	54,6	86,4 (89)	82,8	90,7
4-GlcNAc	0,1	0,3	0,3	1,1	1,1	1,1
Total	0,1 (n.d.)	0,3	0,3	1,1 (n.d.)	1,1	1,1

n.d. – não determinado na análise de açúcares, **v-** quantidades vestigiais, ***** - valores da tabela 3

Tabela 6: Ligações glicosídicas do snRF e RF da LEx com e sem hidrólise enzimática.

Ligação Glicosídica	Fração (% mol)					
	snRF *	snRF amilase	snRF celulase	RF *	RF amilase	RF celulase
t-Man	21,1	24,5	27,3	2,4	8,6	3,9
2-Man	13,1	17,7	8,6	1,2	4,7	1,6
3-Man	4,3	4,9	-	-	1,9	-
4-Man	0,5		-	-	-	-
6-Man	1,2	1,5	2,4	-	0,9	3,5
2,6-Man	13,4	43,9	7,1	2,5	7,4	4,2
3,6-Man	-	0,4	-	-	0,6	-
2,3,6-Man: 2,4,6-Man	0,6	0,5	-	-	-	-
2,3,4,6-Man	1,3	0,3	-	0,9	0,4	0,6
Total	55,6 (52)	93,7	45,4	7,0 (4)	24,5	13,8
t-Glc	5,4	1,0	14,9	10,0	13,0	14,8
3-Glc	0,8	-	-	17,3	21,8	20,1
4-Glc	27,1	3,0	25,7	42,7	17,0	29,3
6-Glc	1,2	0,3	5,6	9,3	10,1	6,9
2,3-Glc	-	-	v	1,0	1,5	v
3,4-Glc	-	-	v	0,4	0,3	v
3,6-Glc	-	-	v	2,2	2,0	v
4,6-Glc	1,7	1,1	8,3	5,4	5,3	14,3
2,3,4,6-Glc	6,6	0,3	-	3,7	3,2	0,8
Total	42,9 (41)	5,7	54,6	92,0 (90)	74,2	86,2
4-GlcNAc	0,6	0,6	-	0,5	1,3	-
Total	0,6 (n.d.)	0,6	-	0,5 (n.d.)	1,3	-

n.d. – não determinado na análise de açúcares, v- quantidades vestigiais, *- valores da tabela 4

Na hidrólise enzimática do snRF e RF com a α -amilase foi utilizado como controlo positivo a amilose sem pré-tratamento, polissacarídeo constituído por glucose em ligações α -(1→4), e como controlo negativo papel, composto por celulose com glucose em ligação β -(1→4). Como esperado a hidrólise do papel higiénico (celulose) com a α -amilase não ocorreu, e a hidrólise da amilose teve um rendimento de reação de 60 e 72 % para a LIn e LEx respetivamente.

Na hidrólise enzimática com a celulase utilizou-se como controlo positivo o papel e como controlo negativo a amilose. No controlo negativo tratado com a celulase não ocorreu reação, enquanto a hidrólise do papel higiénico para a LIn e LEx foi hidrolisado com baixo rendimento de reação de 19 e 26 % respetivamente.

No geral, em ambas as hidrólises enzimáticas, por diminuição da percentagem molar relativa da ligação (1→4) a percentagem molar das restantes ligações aumenta. Na hidrólise do RF da LIn o total de manose diminui, possivelmente por perda durante a diálise. Este resultado foi também observado depois de efetuada nova diálise do RF, o que resultou numa perda por diálise de massa de aproximadamente 10%, com diminuição da manose do RF. Esta perda mostra que o RF ainda continha polímeros pequenos de manose.

No snRF da LIn, o tratamento com α -amilase levou à diminuição da percentagem molar de (1→4)-Glc de 21 % para 7 %, uma redução de 14 %. Com a celulase a diminuição da percentagem molar da ligação (1→4)-Glc no snRF da LEx foi de apenas 0,8%. No global das glucanas (1→4) do snRF 65 % dos resíduos estão em ligações α -(1→4) e apenas 4% em ligação β -(1→4). Nenhuma das reações de hidrólise foi completa e pelos resultados obtidos ficou por definir a configuração anomérica de 31 % dos resíduos de glucose em ligação (1→4) no snRF da LEx. Para o snRF da LEx a hidrólise com α -amilase levou à diminuição de (1→4)-Glc de 27 para 3 %. Na reação com a celulase a percentagem molar da glucose em ligação (1→4) diminuiu apenas de 27 para 26 %. No balanço global da configuração das glucanas (1→4) do snRF da LEx, 89 % dos resíduos estarão em ligação α -(1→4) e apenas 5% em ligação β -(1→4). Apesar da reduzida quantidade de glucose em ligação β -(1→4) solubilizada no snRF, é confirmada a presença de ligações β -(1→4) para ambas as leveduras LIn e LEx.

O RF da LEx foi hidrolisado pela α -amilase ocorrendo uma diminuição de 26 % mol das 43 % de ligações (1→4)-Glc presentes. No tratamento com a celulase o RF da LEx passou de 43 % de glucose em ligação (1→4) para 29 %, uma diminuição de 13 % mol de ligações β -(1→4). No balanço global das glucanas (1→4) do RF, 60 % dos resíduos estarão em ligação α -(1→4) e 32 % em ligação β -(1→4).

O RF da LIn foi hidrolisado pela α -amilase e celulase, com uma diminuição de percentagem molar da ligação (1→4)-Glc de 11 % e 5 % respetivamente. No balanço global, as glucanas (1→4) do RF da LIn 67% dos resíduos de glucose apresentam configuração α -(1→4) e 31 % configuração β -(1→4).

A presença de glucose em ligação β -(1→4) foi recentemente descrita para o resíduo obtido após extração sequencial alcalina até 8M de KOH para a *S. pastorianus* cervejeira excedentária [35]. Os resultados aqui obtidos, corroboram a presença de β -(1→4) glucanas

na levedura excedentária, mas também no inóculo inicial, evidenciando que estas ligações são características da levedura *S. pastorianus*.

Na figura 15 são evidenciadas as alterações da composição dos polissacarídeos da parede celular (RF) do inóculo *S. pastorianus* e da levedura excedentária, mostrando que a levedura modifica os seus polissacarídeos durante o processo cervejeiro, havendo uma diminuição de glucanas β -(1 \rightarrow 3) por incremento de glucanas α -(1 \rightarrow 4) e glucanas β -(1 \rightarrow 4), em proporção idêntica.

O conteúdo do glicogénio da parede celular depende do estado nutricional das células, do método de isolamento e da fase de crescimento em que as leveduras são recolhidas. É possível que o estado celular da LEx se diferencie da LIn devido ao *stress* a que foi sujeita, e o incremento do glicogénio insolúvel na sua parede seja essencial para a manutenção da osmotolerância da levedura com o decorrer dos ciclos fermentativos [91].

Por sua vez, o aumento de glucanas β -(1 \rightarrow 4) poderá estar associado a um aumento de resistência da parede da *S. pastorianus*. Apesar de não se confirmar a génese das ligações β -(1 \rightarrow 4) em resposta a *stress* do processo cervejeiro, é notória a influência do processo no incremento destas ligações na levedura.

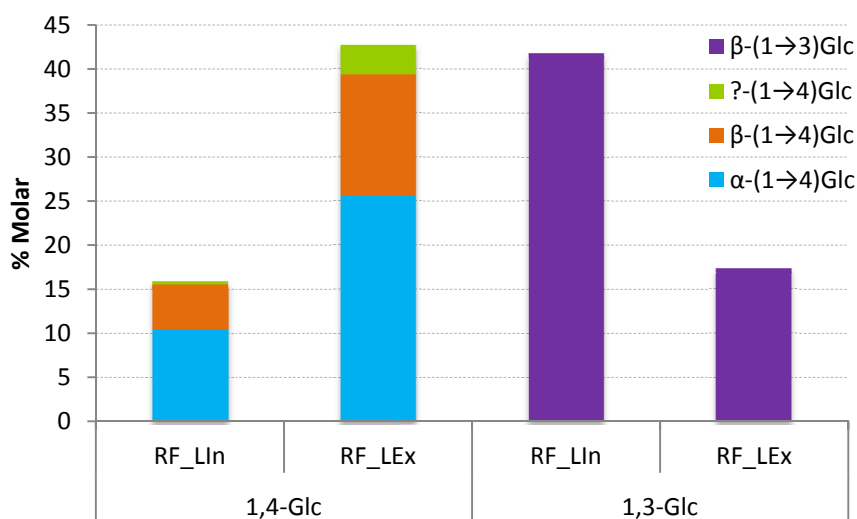


Figura 15: Percentagem molar de α -(1 \rightarrow 4) Glc, β -(1 \rightarrow 4) Glc e β -(1 \rightarrow 3) Glc presentes no resíduo final das LIn e da LEx. (Os resíduos de Glc em ligação (1 \rightarrow 4) com configuração anomérica por caraterizar estão identificados por ?-(1 \rightarrow 4) Glc, possivelmente em ligação β).

3.1.4. Avaliação da atividade imunoestimuladora

Para avaliar o potencial imunoestimulador dos polissacarídeos da *S. pastorianus* foram testadas amostras provenientes da hidrólise enzimática, com α -amilase e celulase, do RF da LIn e da LEx. Como as amostras RF_Cel e RF_Ami da LIn e LEx apresentam baixa solubilidade e por citometria de fluxo apenas é possível estudar amostras solúveis, as amostras foram colocadas a solubilizar em 1 mL de PBS esterilizado, com agitação durante 4 dias. Pontualmente, as amostras foram submetidas durante 15 min a ultrassons e 10 min a um banho de 100°C, para incrementar a solubilização dos açúcares no PBS.

Por citometria de fluxo analisaram-se 2 réplicas para cada amostra, e os resultados foram obtidos na forma de citogramas. Na figura 16 estão representados os citogramas de uma das réplicas analisadas, através dos quais é possível distinguir células B de outras células presentes (eixo das abcissas), e células ativadas de não ativadas (eixo das ordenadas). A percentagem de ativação linfocitária é determinada pela razão de células B ativas (2º quadrante) com o número total de células B (soma do 2º e 4º quadrante).

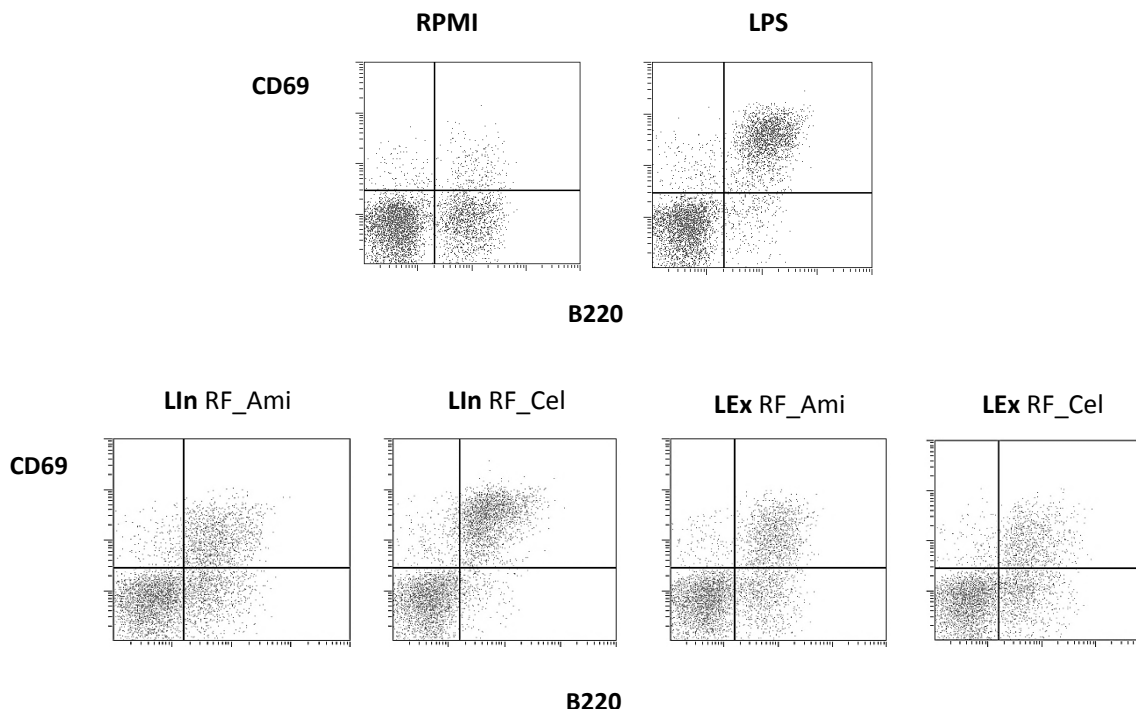


Figura 16: Expressão de CD69 à superfície de linfócitos B (B220) de células esplênicas de ratinhos em meio RPMI (controlo negativo), LPS (controlo positivo) e das amostras LIn RF_Ami, LIn RF_Cel, LEx RF_Ami e LEx RF_Cel.

Atendendo às percentagens de ativação de células B (Figura 17), verificou-se uma ativação para o controlo negativo RPMI de 9,3 %, e para o controlo positivo LPS de 87 % (Figura 16). Todas as amostras apresentaram atividade imunoestimuladora de células B, com maior percentagem de ativação para o RF_Cel da LIn (78 %), com uma concentração total de açúcares de 24 µg/mL. Em contrapartida, o RF_Cel da LEx foi a amostra que apresentou menor atividade (39 %) e uma difícil separação entre células B e outras células não ativadas. Esta amostra solubilizou uma quantidade elevada de açúcares, e a concentração testada, 100 µg/mL, parece ter afetado a viabilidade/comportamento celular.

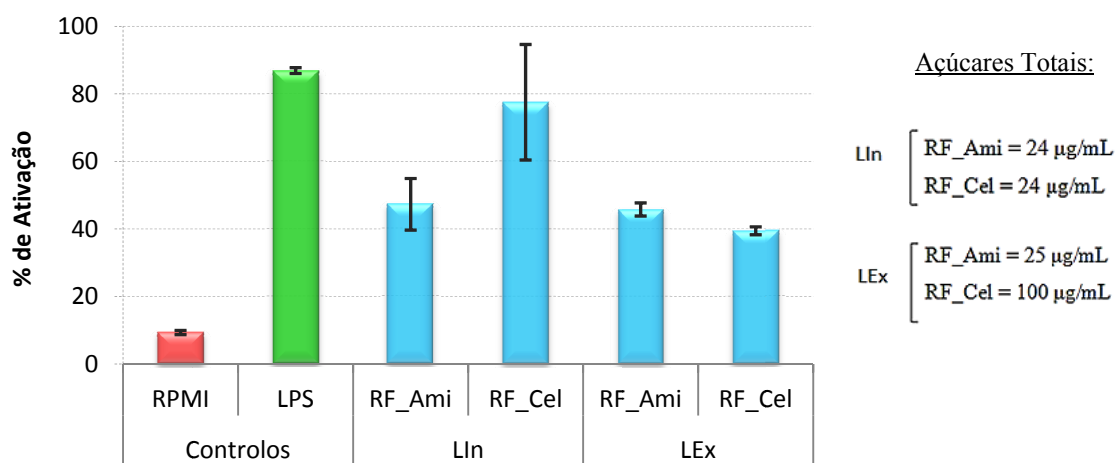


Figura 17: Efeito imunoestimulador em linfócitos B expresso em percentagem de ativação do RPMI (controlo negativo), LPS (controlo positivo) e resíduos da LIn e LEx. (À direita as concentrações no poço ELISA das amostras em açúcares totais).

A concentração de açúcares solubilizados foi determinada por análise de açúcares. Sabendo a concentração adicionada ao poço e a percentagem molar das ligações glicosídicas, foi possível calcular a concentração no poço de cada ligação de resíduos presentes nas amostras (Tabela 7).

Tabela 7: Concentração das diferentes ligações glicosídicas adicionadas aos poços da placa ELISA. (Entre parêntesis encontram-se os valores da análise de açúcares).

Ligação Glicosídica	Concentração no poço (µg/mL)			
	LIn		LEx	
	Amilase	Celulase	Amilase	Celulase
t-Man	2,8	5,6	4,4	3,1
2-Man	2,0	4,1	1,8	3,0
3-Man	-	1,1	-	-
6-Man	0,3	0,5	v	1,9
2,6-Man	3,8	5,2	2,3	1,8
Total	8,8 (8,7)	16,6 (16,7)	8,6 (9,9)	9,8 (10,4)
t-Glc	5,3	2,0	3,8	16,0
3-Glc	0,3	1,0	0,7	0,3
4-Glc	7,5	1,9	8,7	63,4
6-Glc	0,9	2,2	1,3	1,2
4,6-Glc	1,2	0,1	1,8	9,9
Total	15,2 (15,3)	7,3 (7,1)	16,4 (15,0)	90,8 (96,2)

Pela análise da tabela 7, verifica-se que para uma mesma quantidade de açúcares adicionados ao poço ($\approx 24 \mu\text{g/mL}$), o que distingue os RF_Ami da LEx, RF_Ami e RF_Cel da LIn é a quantidade superior de manose presente no RF_Cel da LIn, numa proporção de 2:1. Para o RF_Cel da LIn, não só o conteúdo em manose como a atividade imunoestimuladora observada são duas vezes superiores (Figura 18). Também a presença de manose em ligação (1→3) nesta amostra sugere a presença de estruturas com a sequência terminal α -(1→3)-Man- α -(1→2)-Man. Esta estrutura antigénica foi caracterizada em *S. cerevisiae*, estando envolvida na ativação de células B [69].

Para verificar uma relação entre a atividade observada e os açúcares adicionados aos poços ELISA foi efetuada uma correlação gráfica destes parâmetros (gráficos não exibidos). Verifica-se que existe uma correlação linear entre a atividade observada com o conteúdo total de manose ($r^2 = 0,8922$) e com a manose em ligação (1→2,6) ($r^2 = 0,8221$), contudo não existe correlação entre a atividade e a concentração de glucanas adicionadas ($r^2 < 0,4$). Assim, a atividade observada poderá dever-se às manoproteínas presentes nas amostras solubilizadas.

Apesar de conteúdos similares em manoproteínas solubilizadas no RF_Ami e RF_Cel da LEx (figura 18), a atividade inferior do RF_Cel da LEx poderá ser justificado

pelo excesso de açúcares totais adicionados ao poço (90 µg de glucose e 10 µg de manose), complementados pela observação de perda de viabilidade celular.

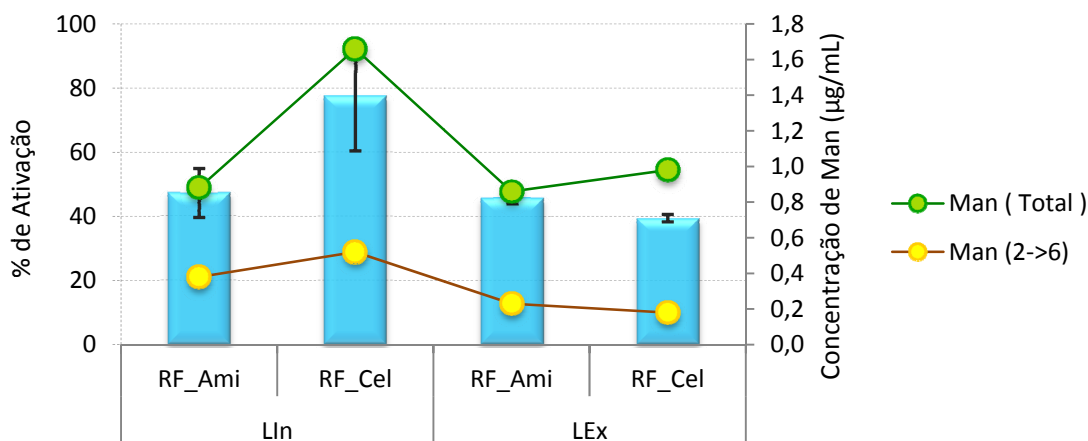


Figura 18: Percentagem de ativação de células B (barras azuis) relacionada com a concentração de manoproteína total (bolinhas verdes) e ramificação (2→6)-Man (bolinhas amarelas)

Como as manoproteínas das amostras permaneceram no RF, após extração dos polissacarídeos com soluções alcalinas fortes (4M KOH), estas poderão estar covalentemente ligadas às glucanas ou poderão conter ligações β entre os manosídeos. A ocorrência de manose em ligação β -(1→2) na parede celular de fungos patogénicos como a *C. albicans* (figura 7, capítulo 1), constituem antígenos importantes para a sua patogenicidade e resposta do sistema imunitário do hospedeiro. Posto isto, também a *S. pastorianus* poderá conter β -(1→2) manosídeos (numa parte mais interna da camada de manoproteínas) a desencadear atividade imunoestimuladora nas células B esplénicas do ratinho.

Uma razão que poderá ter contribuído para a solubilização das manoproteínas em PBS poderá relacionar-se com os resíduos terem sido previamente hidrolisados com uma celulase e uma α -amilase. Com a hidrólise enzimática, principalmente das ligações β -(1→4)-Glc, a malha de glucanas terá ficado menos compacta o que facilitou a solubilização das manoproteínas.

Apesar dos resultados parecerem indicar que a atividade imunoestimuladora foi desencadeada pela manoproteínas, a presença de glucanas nas amostras não permite descartar influência destas na ativação observada. Pode colocar-se em hipótese que a ativação de células B observada, não ocorra pelos polímeros como entidades isoladas, mas sim por um complexo entre manoproteína-glucana.

3.2. Outras leveduras

Com o objetivo de avaliar a presença de β -(1 \rightarrow 4)-glucanas em outras leveduras, foi estudada a composição polissacarídica da parede celular de *S. cerevisiae*, uma das leveduras progenitoras da *S. pastorianus*, e de *Candida albicans*, levedura filogeneticamente afastada da *S. pastorianus*. A *S. cerevisiae* estudada, tal como a *S. pastorianus*, é uma levedura utilizada na fermentação de bebidas, em particular vinho branco, rosé e tinto. Por outro lado, a *Candida albicans* é uma levedura modificada, sujeita a diferentes níveis de incorporação de leucina nas proteínas codificadas por genes contendo códons CUG. O estudo desta *C. albicans* modificada teve como objetivo não só verificar a existência de β -(1 \rightarrow 4)-glucanas, como também averiguar que alterações nas manoproteínas da parede celular por diminuição da âncora de serina.

3.2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

A *S. cerevisiae* analisada foi utilizada em 4 condições de fermentação vínica diferentes:

- Branco MF – *S. cerevisiae* recolhida a meio da fermentação do vinho branco
- Branco FF – *S. cerevisiae* recolhida no final da fermentação do vinho branco*
- Rosé MF – *S. cerevisiae* recolhida a meio da fermentação do vinho rosé
- Tinto FF – *S. cerevisiae* recolhida no final da fermentação do vinho tinto

*Amostra tratada com carvão e bentonite

Tal como para a *S. pastorianus*, as paredes celulares da *S. cerevisiae* foram isoladas com uma extração preliminar em ultrassons e com a preparação do AIR. A composição em açúcares das quatro leveduras e dos respetivos AIRs foi determinada por GC-FID, e os valores médios das réplicas encontram-se compilados na tabela 8.

Tabela 8: Rendimentos, percentagem molar e concentração de hidratos de carbono (HC) extraídos da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Amostra	η massa (%)	η HC extraídos (%)	Hidratos de Carbono (% mol)								Total HC ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
			dRib	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
Branco MF	-	-	1	-	-	9	7	-	77	6	567
AIR Branco MF	89	79	3	-	-	6	10	-	78	2	505
Branco FF	-	-	9	4	2	1	26	2	35	21	126
AIR Branco FF	86	77	4	4	2	1	36	1	45	7	112
Rosé MF	-	-	4	4	-	-	24	-	56	11	208
AIR Rosé MF	80	65	1	4	1	-	28	-	61	5	169
Tinto FF	-	-	2	2	1	1	19	1	69	4	323
AIR Tinto FF	73	71	2	3	1	-	22	-	69	2	313

A levedura da fermentação do vinho branco apresenta um teor de carboidratos de 57 % quando recolhida a meio da fermentação e apenas de 13% quando recolhida no final da fermentação. O baixo teor de açúcares determinado para o Branco FF pode resultar de interferência do carvão e bentonite presentes na amostra, por esta estar contabilizada como massa de levedura na análise de açúcares. No entanto, um decaimento da percentagem molar de açúcares na levedura também seria de esperar por perda de integridade da estrutura com o decorrer da fermentação. Contrariamente à *S. pastorianus* a *S. cerevisiae* não é reutilizada na fermentação pois a sua viabilidade celular é perdida no processo.

Para todas as leveduras com a preparação do AIR o total de carboidratos diminui, por extração do conteúdo intracelular, nomeadamente pequenos oligossacarídeos e glicogénio. No geral confirma-se que as paredes celulares da *S. cerevisiae* são compostas maioritariamente por glucanas e posteriormente manoproteínas, como reportado na literatura [20, 21, 37] e também verificado na *S. pastorianus*.

As frações AIR de *S. cerevisiae* foram metiladas para conhecer o perfil de ligações glicosídicas das paredes celulares (tabela 9).

Tabela 9: Ligações glicosídicas das quatro frações AIR de *S. cerevisiae*. Entre parêntesis encontram-se os valores da análise de açúcares

Ligação Glicosídica	Fração (% mol)			
	AIR Branco MF	AIR Branco FF	AIR Rosé MF	AIR Tinto FF
4-Xyl	6,4	1,5	0,7	0,3
Total	6,4 (6)	1,5 (1)	0,7 (0)	0,3 (0)
t-Man	1,3	21,6	16,1	14,0
2-Man	0,3	9,4	9,4	6,4
3-Man	-	4,6	3,3	-
4-Man	6,5	-	-	-
6-Man	-	1,2	1,5	1,9
2,6-Man	0,4	8,8	13,7	8,8
3,6-Man	-	-	-	-
2,3,4,6-Man	-	-	0,5	0,2
Total	8,4 (10)	45,6 (36)	44,5 (28)	31,3 (22)
t-Glc	1,1	5,5	6,5	9,5
3-Glc	0,1	7,1	8,9	7,7
4-Glc	82,8	31,1	20,8	31,7
6-Glc	0,2	5,4	12,4	14,6
2,3-Glc	-	0,6	1,5	0,8
3,4-Glc	-	-	-	-
3,6-Glc	-	-	1,1	1,1
4,6-Glc	0,4	0,8	1,3	2,0
2,3,4,6-Glc	0,6	2,5	2,2	1,0
Total	85,2 (78)	53,0 (45)	54,7 (61)	68,4 (69)

Pela análise de metilação é possível verificar que a glucose em ligação (1→4) é a principal ligação em todas as *S. cerevisiae* analisadas. Com maior conteúdo de glucanas e glucose em ligação (1→4), no AIR Branco MF as glucanas são constituídas por uma cadeia linear de (1→4)-Glc pouco ramificada. As glucanas com ligação (1→3) e (1→6) estão maioritariamente presentes para o AIR no Rosé MF e Tinto FF.

Relativamente às manoproteínas, no AIR Branco MF estão presentes apenas 8,4 %, com a manose maioritariamente em ligação (1→4). Por outro lado os AIRs Branco FF, Rosé MF e Tinto FF são constituídos por cadeias de manose em ligação (1→6) ramificadas em manose (1→2,6). Para todos os AIRs identificou-se a presença de (1→4)-Xyl que pode ocorrer na parede celular por ligação às manoproteínas.

A presença de glucose em ligação (1→4) nos AIRs parece associar-se a um teor elevado de glicogénio insolúvel na parede celular das leveduras. A presença de glicogénio na parede celular de *S. cerevisiae* tem crucial importância para osmotolerância da levedura. Contrariamente ao glicogénio intracelular que não sofre variações significativas, o glicogénio da parede celular aumenta exponencialmente até níveis de etanol de 8 % (v/v). A *S. cerevisiae* acumula glicogénio na parede até 3 vezes mais que no meio intracelular, no entanto, para concentrações elevadas de etanol, o teor de glicogénio diminui por dissolução, a parede e a membrana perdem a integridade culminando com a redução da viabilidade celular. [92]

Para o AIR da levedura que fermentou vinho branco é possível verificar que o teor de glucose em ligação (1→4) é superior a meio da fermentação (83 %) comparativamente ao final do processo (31%), quando o teor alcoólico é superior e a viabilidade celular reduzida. De referir que a perda de glucose em ligação (1→4) no final da fermentação, conduziu à diminuição da % molar de glucanas com incremento da % molar de manoproteínas presentes.

O teor elevado de glucanas (1→4) observado para os AIRs acresceu o interesse em investigar a presença de glucose em ligação β -(1→4) em *S. cerevisiae*. Para tal, os AIRs foram hidrolisados enzimaticamente com α -amilase e celulase e as ligações glicosídicas dos hidrolisados estão descritas na tabela 10.

Tabela 10: Ligações glicosídicas dos AIRs de *S. cerevisiae* hidrolisados com α -amilase e celulase

Ligação Glicosídica	Fração (% mol)							
	AIR Branco MF		AIR Branco FF		AIR Rosé MF		AIR Tinto FF	
	Amilase	Celulase	Amilase	Celulase	Amilase	Celulase	Amilase	Celulase
4-Xyl	5,2	4,2	1,0	1,0	-	-	-	0,8
Total	5,2	4,2	1,0	1,0	-	-	-	0,8
t-Man	3,1	1,9	12,0	10,5	11,6	12,8	9,3	7,2
2-Man	1,1	1,4	7,6	5,3	5,3	7,5	4,3	2,9
3-Man	-	-	4,4	0,4	0,4	3,7	0,4	0,5
4-Man	2,4	3,0	0,8	0,7	-	-	-	0,5
6-Man	0,3	0,9	4,6	1,3	1,3	1,2	1,3	0,9
2,6-Man	2,2	2,7	12,0	13,8	13,5	11,2	12,4	6,9
3,6-Man	0,1	-	0,4	0,5	0,4	-	0,4	-
2,3,4,6-Man	0,1	2,7	0,2	1,1	0,1	0,2	0,1	0,2
Total	9,3	12,6	42,0	33,6	32,6	36,6	28,2	19,1
t-Glc	2,9	1,9	4,6	4,7	5,8	6,6	6,1	5,2
3-Glc	2,8	1,1	10,3	8,2	11,2	8,9	13,4	9,4
4-Glc	76,4	80,5	35,4	42,6	39,6	37,7	36,5	47,4
6-Glc	1,3	0,9	4,6	3,9	4,9	4,6	8,1	5,5
2,3-Glc	0,1	-	0,2	0,3	0,4	-	0,7	-
3,4-Glc	0,4	0,3	-	0,2	0,1	-	0,2	-
3,6-Glc	0,2	-	0,8	-	0,8	0,8	2,0	0,9
4,6-Glc	1,2	1,1	3,0	3,3	3,9	3,9	4,1	2,9
2,3,4,6-Glc	0,2	0,6	1,3	1,8	0,7	0,8	0,5	8,5
Total	85,5	86,4	60,2	65,0	67,4	63,3	71,6	79,8
1,4-GlcNAc	-	-	0,2	0,2	0,1	-	-	-
Total	-	-	0,2 (n.d.)	0,2 (n.d.)	0,1 (n.d.)	-	-	-

n.d. – não determinado na análise de açúcares

Pelas ligações glicosídicas das hidrólises enzimáticas verifica-se um aumento do teor de glucose em ligação (1→4) e das ramificações de glucose em (1→4,6), com uma diminuição no geral das restantes ligações. Perante isto conclui-se que durante a diálise realizada após hidrólise enzimática saíram pequenos oligossacarídeos presentes no AIR, incluindo cadeiras pequenas de manose em ligação (1→2) cuja presença foi já confirmada pela análise de ligações glicosídicas dos AIRs. A sustentar a hipótese de perda de material pequeno na diálise está também a elevada perda de massa após diálise. Das 10 mg pesadas para a hidrólise enzimática, após diálise e pesagem da massa liofilizadas verificou-se uma perda de massa até 70 % para ambas as hidrólises enzimáticas.

Com o intuito de retirar conclusões das hidrólises enzimáticas de *S. cerevisiae* foi necessário perceber que ligações e que percentagem molar que se perdia durante a diálise. Neste sentido os AIRs da *S. cerevisiae* foram dialisados contra água, e após 5 mudas foi realizada análise de metilação. As ligações glicosídicas dos AIRs dialisados estão compiladas na tabela 11.

Tabela 11: Ligações glicosídicas do AIR das leveduras *S. cerevisiae* após diálise (5 mudas)

Ligação Glicosídica	Fração (%mol)			
	AIR Branco MF	AIR Branco FF	AIR Rosé MF	AIR Tinto FF
4-Xyl	5,5	0,6	-	-
Total	5,5	0,6	-	-
t-Man	2,1	14,0	11,3	6,7
2-Man	1,0	6,9	7,4	3,9
3-Man	-	3,6	3,5	0,3
4-Man	2,7	v	v	v
6-Man	0,1	1,0	1,1	0,8
2,6-Man	1,7	7,5	14,9	10,5
3,6-Man	-	0,8	-	0,4
2,3,4,6-Man	0,6	1,0	0,3	1,7
Total	8,2	34,8	38,5	24,3
t-Glc	2,7	6,4	5,6	4,4
3-Glc	1,0	13,1	10,7	11,2
4-Glc	77,7	32,0	31,8	29,4
6-Glc	0,6	4,6	4,1	7,3
2,3-Glc	0,2	-	0,3	0,5
3,4-Glc	0,3	-	0,2	0,3
3,6-Glc	-	0,8	0,9	2,1
4,6-Glc	1,4	2,4	4,1	4,1
2,3,4,6-Glc	2,1	5,6	3,4	15,9
Total	86,0	64,9	61,1	75,2
1,4-GlcNAc	0,1	0,4	0,4	0,4
Total	0,1(n.d.)	0,4 (n.d.)	0,4 (n.d.)	0,4 (n.d.)

n.d. – não determinado na análise de açúcares

Durante a diálise registou-se uma perda de massa de 19% para o AIR Tinto FF até 66 % para o AIR Branco FF. Pelas ligações glicosídicas dos AIRs dialisados confirma-se o enriquecimento em percentagem molar da glucose em ligação (1→4) e ramificações (1→4,6), com decréscimo de ligações manose, em especial manose terminal e em ligação (1→2).

Apesar da diálise dos AIRs da *S. cerevisiae*, o teor de glucose em ligação (1→4) dos dialisados continua inferior aos AIRs hidrolisados enzimaticamente, o que impossibilita concluir sobre a configuração anomérica dos resíduos.

Perante a estrutura pouco ramificada das (1→4)-glucanas dos AIRs pode colocar-se em questão que por semelhança ao amido, em concreto amilopectina, estas glucanas não hidrolisem quando desidratadas. A hidratação do amido, conhecida como gelatinização, é uma condição necessária para uma eficiente hidrólise deste polissacarídeo. Como também para elevadas concentrações de etanol o amido não gelatiniza, na preparação do AIR com etanol a 80% as (1→4)-glucanas devem ter adquirido resistência à hidrólise enzimática, em semelhança com o que ocorre ao amido [93]. Para possibilitar a hidrólise enzimática das α -(1→4)-glucanas necessitariam de ser reidratadas, tratando o AIR com água fervente, ou a hidrólise ser realizada a temperaturas elevadas com enzimas termoestáveis.

Verifica-se, no entanto, que a celulase não hidrolisou glucose em ligação (1→4), concluindo-se por isso que na *S. cerevisiae* não estão presentes glucanas β -(1→4). Por exclusão de partes, a *S. cerevisiae* será contrariamente à *S. pastorianus*, essencialmente constituída por glucanas α -(1→4).

3.2.2. *Candida albicans*

As amostras de *C. albicans* analisadas diferenciam-se pela fase de crescimento a que foram recolhidas, exponencial ou estacionária, e pela percentagem de modificação genética. A modificação genética ocorreu ao nível do tRNA, conduzindo a diferentes percentagens de incorporação de Leu em vez de Ser na leitura do codão GUC do mRNA, tendo-se:

- T0 = incorporação de 2 % de leucina (Controlo)
- T1 = incorporação de 21 % de leucina
- T1K1 = incorporação de 51 % de leucina
- T2K1 = incorporação de 81 % de leucina
- T2K2 = incorporação de 99 % de leucina

Tal como para a *S. cerevisiae*, as diferentes amostras de *C. albicans* foram sujeitas a ultrassons e preparação dos AIRs. Foi efetuada análise de açúcares presentes nos AIRs da *C. albicans* (3 réplicas). Os valores médios obtidos encontram-se na tabela 12.

Tabela 12: Percentagem molar e concentração de hidratos de carbono (HC) extraídos dos AIRs da levedura *Candida albicans*.

Fase	Amostra	Hidratos de Carbono (% mol)					Total HC (µg/mg)
		dRib	Rib	Man	Glc	Ác.Ur.	
Exponencial	T0	4	6	35	50	4	428
	T1	4	5	38	50	3	397
	T1K1	4	5	37	52	1	400
	T2K1	5	6	30	58	1	416
	T2K2	4	5	38	49	2	411
Estacionária	T0	4	2	40	50	3	332
	T1	2	3	41	49	5	446
	T1K1	3	4	42	51	1	388
	T2K1	4	2	42	51	-	373
	T2K2	-	5	33	61	1	283

Pela análise de açúcares verifica-se um perfil semelhante no tipo e percentagem molar de carboidratos dos AIRs da *C. albicans*. Na fase exponencial o total de açúcares médio é de cerca de 410 µg/mg, com aproximadamente 50% de glucanas e 35% de manoproteínas. Na fase estacionária o AIR da T2K2 destaca-se pela sua quantidade inferior de carboidratos totais, apenas 28% contudo com teor em glucose superior (61 % molar). Em menores quantidades foram encontrados ácidos urónicos, ribose e desoxirribose.

Com a análise de metilação, tabela 12, verifica-se uma discrepância entre o somatório das ligações glicosídicas e a composição em hidratos de carbono da análise de açúcares. Pela análise de açúcares observa-se presença maioritária de glucanas enquanto pela metilação as manoproteínas surgem como os polissacarídeos maioritários. No entanto, é coincidente com a análise de açúcares a presença de um teor superior de glucanas para a T2K1 da exponencial e T2K2 da estacionária.

Tabela 12: Ligações glicosídicas dos AIRs de *C. albicans*. (Entre parêntesis encontram-se os valores da análise de açúcares).

Ligação Glicosídica	Fração (% mol)									
	Exponencial					Estacionária				
	T0	T1	T1K1	T2K1	T2K2	T0	T1	T1K1	T2K1	T2K2
t-Man	7,9	14,3	18,1	14,9	10,1	19,9	26,7	25,0	16,4	15,9
2-Man	42,6	38,6	43,3	27,3	32,5	40,5	41,5	39,3	33,2	27,4
3-Man	0,9	1,6	1,7	1,1	1,9	1,5	1,1	1,0	1,1	1,1
6-Man	9,2	3,6	7,9	9,6	7,5	3,2	1,3	1,5	8,3	1,9
2,6-Man	8,3	3,7	6,1	6,8	11,2	3,6	0,8	1,0	10,8	1,4
3,6-Man	1,9	1,9	1,4	0,9	3,4	2,4	0,9	1,4	2,0	1,5
2,3,4,6-Man	1,4	4,2	0,5	0,1	3,1	1,0	0,6	0,3	0,5	2,3
Total	72,2 (35)	67,9 (38)	79,0 (37)	60,7 (30)	69,7 (38)	72,1 (40)	72,9 (41)	69,5 (42)	72,3 (42)	51,5 (33)
t-Glc	1,3	2,2	2,0	3,2	1,7	2,5	3,7	3,8	1,8	5,4
3-Glc	7,5	13,6	8,4	21,8	9,1	10,9	12,3	12,1	5,5	11,7
4-Glc	5,6	3,9	2,1	2,9	1,4	2,5	3,1	2,5	2,8	5,2
6-Glc	8,4	4,6	5,9	7,3	8,5	5,1	2,8	4,1	7,2	7,6
2,3-Glc	0,8	0,8	0,6	1,3	1,6	0,8	0,7	0,7	3,5	2,0
3,4-Glc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,6-Glc	0,6	0,8	0,4	0,6	1,2	0,8	0,4	0,7	-	1,2
4,6-Glc	0,4	0,3	-	0,2	0,5	0,4	-	-	0,8	0,3
2,3,4,6-Glc	1,6	4,1	0,4	0,3	3,2	1,4	1,8	2,3	2,6	9,4
Total	26,2 (50)	30,3 (50)	19,8 (52)	37,6 (58)	27,2 (49)	24,4 (50)	24,8 (49)	26,2(51)	24,2 (51)	42,8 (61)
1,4-GlcNAc	1,4	1,6	1,2	1,6	3,3	3,3	2,0	3,5	3,0	0,8
Total	1,4 (n.d.)	1,6 (n.d.)	1,2 (n.d.)	1,6 (n.d.)	3,3 (n.d.)	3,3 (n.d.)	2,0 (n.d.)	3,5 (n.d.)	3,0 (n.d.)	0,8 (n.d.)

n.d. – não determinada na análise de açúcares

Pela análise das ligações glicosídicas verifica-se que as manoproteínas são constituídas principalmente por cadeias de manose com ligação (1→2) e (1→6), altamente ramificadas por manose (1→2,6). Estes resultados estão de acordo com as manoproteínas do tipo *N* características da *C. albicans* que se distinguem pela cadeia principal de manose α -(1→6) ramificada em (1→2,6) com α -(1→2) manosídeos. Na parte terminal das cadeias laterais de α -(1→2) manosídeos encontram-se ligados os β -(1→2) manosídeos, que conferem esteroespecificidade as manoproteínas da *C. albicans* [40].

Contrariamente à *S. pastorianus* e à *S. cerevisiae*, os AIRs da *C. albicans* analisadas são compostos maioritariamente manoproteínas do tipo *N*.

Relativamente às glucanas, estas são constituídas essencialmente por cadeias de glucose em ligação (1→3) e (1→6), o que permite concluir que nos AIRs estão presentes

glucanas β -(1 \rightarrow 3) e glucanas β -(1 \rightarrow 6). A percentagem molar de glucose em ligação (1 \rightarrow 4) nos AIRs é reduzida, com um máximo de 6 % na T0 da exponencial. Contudo foi realizada a hidrólise enzimática com α -amilase e celulase para inferir sobre a configuração anomérica destes resíduos.

Por análise das ligações glicosídicas dos AIRs tratados com as enzimas, tabela 14, é possível verificar que tal como para a hidrólise dos AIRs da *S. cerevisiae*, também para a *C. albicans* não ocorreu hidrólise enzimática dos AIRs. A quantidade de glucose em ligação (1 \rightarrow 4) após tratamento com a α -amilase e a celulase foi superior à observada nos AIRs. Neste sentido os AIRs foram dialisados para verificar se a glucose em ligação (1 \rightarrow 4) não se encontrava subestimada pela presença de açúcares pequenos, que poderiam ter saído na diálise após tratamento enzimático.

Apesar de se ter registado perda de massa e ligações, em particular (1 \rightarrow 2)-Man com a diálise dos AIRs, a percentagem molar de (1 \rightarrow 4)-Glc obtida continua a não permitir inferir se ocorreu hidrólise enzimática e percentagem de ligações α ou β (tabela 15).

Contrariamente ao verificado para a *S. cerevisiae*, a quantidade reduzida de glucose em ligação (1 \rightarrow 4) em adição à camada externa com teor elevado de manoproteínas ramificadas, e presença de β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6) glucanas, dificultará a acessibilidade do substrato à enzima. Assim, para aferir a configuração anomérica dos resíduos de (1 \rightarrow 4)-Glc nas diferentes *C. albicans* será necessário efetuar uma remoção das manoproteínas, por extração alcalina como efetuado na *S. pastorianus*, incrementando a acessibilidade da glucose em ligação (1 \rightarrow 4), e possibilitar a hidrólise enzimática.

De notar que com as diálises dos AIRs e após tratamento enzimático, por saída de oligossacarídeos, a percentagem molar de N-acetilglucosamina em ligação (1 \rightarrow 4) incrementou pelo menos 10 vezes. A presença do teor elevado de (1 \rightarrow 4)-GlcNAc pode estar relacionado com uma resistência superior da parede da *C. albicans* devido ao seu caráter patogénico dimórfico.

Tabela 13: Ligações glicosídicas dos AIRs de *C. albicans* hidrolisados com α -amilase (AMI) e celulase (CEL).

Ligação Glicosídica	Fração (% mol)																			
	Exponencial										Estacionária									
	T0		T1		T1K1		T2K1		T2K2		T0		T1		T1K1		T2K1		T2K2	
	AMI	CEL	AMI	CEL	AMI	CEL	AMI	CEL	AMI	CEL	AMI	CEL	AMI	CEL	AMI	CEL	AMI	CEL	AMI	CEL
t-Man	7,7	10,4	8,8	8,8	14,3	7,1	9,0	6,7	11,6	9,9	9,7	8,2	18,4	10,3	13,5	9,6	8,2	6,4	9,5	7,0
2-Man	25,4	13,2	26,7	27,5	28,2	19,6	18,6	14,1	29,6	26,4	23,1	22,7	25,8	21,4	30,2	21,7	12,5	12,1	24,9	23,0
3-Man	2,5	0,9	0,8	1,3	0,9	1,2	0,7	0,6	1,6	1,3	1,7	1,4	1,4	1,6	1,8	1,2	0,9	0,6	1,5	1,5
6-Man	3,0	0,8	5,5	3,3	1,5	3,3	4,4	5,0	3,2	2,9	3,8	2,0	1,8	3,3	3,8	2,9	4,9	4,5	3,3	3,6
2,6-Man	5,7	1,4	9,7	5,3	1,5	5,5	5,9	9,5	4,3	4,2	6,3	3,1	1,8	4,4	6,0	3,8	7,8	6,6	6,4	7,6
3,6-Man	3,5	1,7	3,1	3,4	1,0	3,0	1,7	2,0	2,6	2,6	3,9	2,8	1,9	3,1	3,7	2,9	2,1	1,6	2,0	4,1
2,3,4,6-Man	0,3	0,4	0,4	0,8	1,1	1,0	0,4	0,4	0,3	0,6	0,6	0,3	0,2	0,3	0,2	0,7	0,5	0,9	0,8	0,4
Total	48,1	28,8	55,0	50,4	48,5	40,7	40,7	38,3	53,2	47,9	49,1	40,5	51,3	44,4	59,2	42,8	36,9	32,7	48,4	47,2
t-Glc	2,6	3,9	2,2	2,6	3,2	2,3	3,2	2,9	3,1	3,1	2,6	2,6	4,8	3,3	2,8	3,5	2,8	3,0	2,6	2,0
3-Glc	13,7	30,7	7,2	12,5	13,0	18,3	19,4	22,3	13,8	17,1	14,6	21,3	19,8	17,2	9,0	12,1	23,7	23,1	14,9	13,3
4-Glc	10,1	5,7	1,6	3,1	1,8	1,8	4,9	4,2	5,1	9,7	2,3	2,8	2,4	4,3	1,6	4,2	5,5	4,6	1,3	4,6
6-Glc	7,1	6,0	9,5	8,3	4,1	8,5	8,1	9,5	9,1	8,2	10,1	7,4	8,1	10,0	7,7	8,3	8,0	10,5	10,3	9,4
2,3-Glc	1,9	2,3	2,7	2,3	1,2	3,2	3,2	3,0	1,7	1,6	2,2	1,1	1,4	1,8	1,9	1,9	2,6	2,7	2,6	1,5
3,4-Glc	0,2	0,4	0,2	0,2	-	0,3	0,2	0,3	-	0,2	-	0,3	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3
3,6-Glc	1,5	1,5	1,5	1,7	0,5	2,2	1,9	2,4	1,3	1,6	2,1	2,0	1,1	1,7	1,1	1,3	2,0	2,9	2,0	2,1
4,6-Glc	0,4	0,7	0,3	0,4	-	0,3	0,5	0,7	0,2	0,5	0,4	0,3	0,2	0,4	0,3	0,6	0,4	0,4	2,0	0,3
2,3,4,6-Glc	2,1	4,5	2,9	3,8	4,9	8,6	1,9	3,6	1,3	2,9	1,9	2,8	0,9	2,1	0,9	2,3	2,8	6,8	2,1	5,6
Total	39,6	55,7	28,1	34,9	28,7	45,5	43,3	48,9	35,6	44,9	36,2	40,6	38,8	41,0	25,4	34,4	48,1	54,2	38,1	39,1
1,4-GlcNAc	12,0	15,4	16,3	13,3	21,7	12,6	15,4	11,7	10,9	9,2	14,7	18,5	9,6	14,3	15,2	22,4	14,8	11,8	12,5	13,1
Total	12,0	15,4	16,3	13,3	21,7	12,6	15,4	11,7	10,9	9,2	14,7	18,5	9,6	14,3	15,2	22,4	14,8	11,8	12,5	13,1

Tabela 14: Ligações glicosídicas dos AIRs de *Candida albicans* após diálise (5 mudas)

Ligação Glicosídica	Fração (% mol)									
	Exponencial					Estacionária				
	T0	T1	T1K1	T2K1	T2K2	T0	T1	T1K1	T2K1	T2K2
t-Man	6,0	6,7	11,9	7,0	16,8	11,8	10,0	12,9	8,6	12,6
2-Man	18,2	16,8	18,3	10,4	30,2	22,4	24,8	28,2	13,3	26,5
3-Man	0,7	0,7	0,7	0,5	2,0	1,4	1,6	1,9	0,7	1,6
6-Man	2,5	1,6	2,7	2,0	3,4	3,0	3,8	3,2	3,0	3,0
2,6-Man	5,5	4,2	1,4	3,9	4,3	5,2	5,5	4,0	4,0	4,0
3,6-Man	2,2	1,8	-	1,5	1,9	1,7	2,6	1,7	3,3	1,6
2,3,6-/2,4,6-Man	3,3	3,3	-	2,6	0,7	-	0,9	-	-	-
2,3,4,6-Man	9,7	16,3	18,9	10,9	3,8	4,9	4,0	2,8	11,5	4,2
Total	48,1	51,4	53,9	38,8	63,1	50,4	53,2	54,7	44,4	53,5
t-Glc	1,5	1,4	2,9	2,2	3,7	2,9	2,8	2,6	2,7	2,9
3-Glc	4,5	5,2	6,6	14,4	8,7	8,7	6,3	9,4	7,1	10,5
4-Glc	1,7	1,2	2,8	2,1	1,0	1,3	2,2	1,5	0,9	1,2
6-Glc	6,7	5,2	3,5	5,2	8,4	8,2	8,8	6,4	6,1	8,4
2,3-Glc	2,5	2,3	-	3,3	1,6	2,4	2,2	3,8	3,3	3,4
3,4-Glc	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-
3,6-Glc	1,6	1,8	-	2,3	1,3	2,2	2,2	1,3	1,8	-
4,6-Glc	0,6	0,5	-	0,7	0,3	1,1	1,0	0,2	0,5	1,3
2,3,4,6-Glc	16,2	14,7	15,0	13,6	3,2	4,4	3,7	1,6	15,4	3,4
Total	35,3	32,3	30,8	43,8	28,4	31,2	29,2	26,8	37,8	31,1
1,4-GlcNAc	16,2	16,4	15,1	17,3	11,9	18,3	17,9	18,5	17,8	15,1
Total	16,2	16,4	15,1	17,3	11,9	18,3	17,9	18,5	17,8	15,1

Como as *C. albicans* analisadas possuem uma modificação genética que aumenta a incorporação de leucina para o codão CUG que codifica para serina, e a serina é uma âncora de ligação as manoproteínas do tipo *O* foi realizada uma análise de aminoácidos totais para inferir se existem alterações ao nível desta âncora.

Pela tabela 16, analisando as razões de serina e leucina face ao conteúdo total de aminoácidos é possível concluir que, mesmo para a T2K2 em que a incorporação de leucina nos codões CUG é de 99%, não se verificaram alterações ao nível dos aminoácidos das proteínas da parede celular. Este resultado indica que as proteínas da parede celular não são afetadas pela modificação genética, sustentando os resultados da análise de açúcares e ligações glicosídicas em que a variação de carboidratos entre amostras parece advir da variabilidade celular ou do método utilizado.

Tabela 15: Aminoácidos totais dos AIRs de *C. albicans*

Aminoácido	C (mg/g)									
	Exponencial					Estacionária				
	T0	T1	T1K1	T2K1	T2K2	T0	T1	T1K1	T2K1	T2K2
Ala	25,9	13,7	27,1	28,4	12,3	19,4	32,1	24,6	30,6	27,3
Gly	15,4	13,5	15,7	18,4	13,5	11,5	14,9	16,7	17,6	14,7
Val	6,9	5,2	7,2	7,2	4,9	5,8	7,0	7,2	7,5	5,9
Thr	3,8	2,7	4,0	3,9	2,5	4,7	3,7	3,4	4,1	2,8
Ser	3,3	2,9	2,8	2,7	2,6	3,3	2,5	2,3	3,0	2,0
Leu	32,3	24,8	32,3	34,4	24,2	30,2	29,7	30,5	33,2	26,2
Ile	4,7	3,3	4,2	4,7	3,1	3,5	4,4	4,3	4,4	3,7
Pro	13,4	13,0	13,3	17,6	12,5	10,6	10,2	10,2	9,1	8,0
Asx	13,6	7,3	11,3	11,4	6,4	11,3	12,3	8,3	11,5	6,2
Phe	5,5	3,8	5,3	5,6	3,7	3,9	5,0	4,6	5,2	4,3
Glx	26,6	15,0	23,1	24,4	15,0	20,0	21,3	19,0	23,7	15,9
Lys	6,3	3,2	6,0	6,2	3,7	4,3	5,1	4,6	6,6	3,6
Tyr	4,9	2,6	4,0	4,2	2,4	3,2	3,7	3,7	4,4	3,0
Total	162,5	111,1	156,4	169,2	106,9	131,8	152,1	139,4	160,9	123,7
Aminoácido	Razão %									
Ser	2	3	2	2	2	3	2	2	2	2
Leu	20	22	21	20	23	23	20	22	21	21

Segundo Santos *et al.* [16, 17], no genoma de *C. albicans* os codões da família CUN raramente são usados e dentro desta família o codão CUG é o menos frequente. Neste fungo cerca de 33 % dos genes não possuem codões CUG e 57 % dos genes apenas possuem entre 1 a 5 codões CUG. Acrescendo que os genes contendo CUG são expressos em baixo nível na *C. albicans*, a conclusão que as manoproteínas não são afetadas pela incorporação de leucina em detrimento de serina é sustentada.

Como a alteração do código genético em T2K2 conduz à resistência da levedura ao dodecil sulfato de sódio (SDS) e ao CuSO₄, colocou-se em hipótese a existência de grandes alterações na parede celular [94]. No entanto, como no presente trabalho não se verificou alterações a nível dos aminoácidos das proteínas, nem na constituição e tipo de ligações dos polissacarídeos da parede celular, as alterações fenotípicas e a modificação de resistência a fatores como o SDS poderão resultar de modificação na organização dos componentes da parede celular ou da existência de grau de fosforilação superior. Perante isto, seria necessário um estudo detalhado por RMN e/ou espectrometria de massa dos

constituintes da parede celular para compreender o detalhe estrutural nas alterações fenotípicas da *C. albicans* observadas em resposta a alteração do código genético [17].

4. Conclusões

Na primeira parte do presente trabalho foram extraídos sequencialmente os polissacarídeos da parede celular da levedura cervejeira *S. pastorianus*, quer do inóculo inicial (LIn) quer da levedura excedentária (LEx). A aplicação de ultrassons e a preparação de um resíduo insolúvel em álcool (AIR) revelaram-se importantes pré-tratamentos no isolamento das paredes celulares. Com 15 min de ultrassons e com a preparação do AIR foi possível remover material intracelular da levedura, incluindo açúcares solúveis, obtendo-se um resíduo rico em paredes celulares da *S. pastorianus*. Pela análise dos AIRs foi possível verificar que a LIn é constituída por apenas 38 % de polissacarídeos distribuídos em igual proporção de glucanas e manoproteínas (45 %). O AIR da LEx possui um teor superior de polissacarídeos na parede celular, aproximadamente 51 %, distribuídos maioritariamente em 64 % de glucanas e 26 % de manoproteínas.

Da extração com água quente e soluções alcalinas de KOH foi possível solubilizar a camada externa da parede celular. Contudo foi com a extração de 4 M KOH que se solubilizou a maioria das manoproteínas, numa fração com 82 % de manose. Removida a camada externa de manoproteínas e solubilizadas as glucanas alcalino-solúveis após a extração com 4M de KOH obteve-se um resíduo composto essencialmente por glucanas alcalino insolúveis (90 %), em ligação (1→3), (1→4) e (1→6) glucanas. No resíduo final da LEx foi encontrado um conteúdo superior de glucose em ligação (1→4), cerca de 43 % comparativamente à LIn com apenas 16%. Da hidrólise enzimática com α -amilase o teor de (1→4)-Glc da LIn decresceu 67 % e da LEx cerca de 60 %. Com a celulase a (1→4)-Glc do resíduo final diminuiu 31 % para a LIn e 26 % para a LEx. Estes resultados evidenciam a presença de glucose em ligação α -(1→4) e β -(1→4) para ambas as leveduras em proporção similar. A glucose em ligação (1→3) sofre uma diminuição de 42 % na LIn para 17 % na LEx. Apesar da *S. pastorianus* do inóculo inicial já possuir ligações do tipo celulose, com a reutilização no processo cervejeiro a levedura modifica os polissacarídeos da parede, com incremento das ligações (1→4) em detrimento das ligações (1→3). O aumento do teor de polissacarídeos do tipo glicogénio e celulose na levedura pode advir de um aumento da osmotolerância e da resistência da parede perante o *stress* fermentativo. Esta modificação dos polissacarídeos poderá estar a ser influenciada por diversos fatores no decorrer do processo nomeadamente concentração de etanol, densidade do meio fermentativo, pH, temperatura, pressão osmótica e reutilização da levedura.

Na análise da atividade imunoestimuladora de células B esplênicas de ratinho, verificou-se atividade para os polissacarídeos ricos em manoproteínas solubilizadas do RF hidrolisado enzimaticamente. Com uma concentração de 17 µg/mL de manoproteínas solubilizadas do RF_Cel da LIn para 100µL de células esplênica foi registrada uma percentagem de ativação de células B de aproximadamente 78 %. Este resultado desperta interesse nas manoproteínas resistentes à extração sequencial até 4 M KOH, com vista à sua caracterização e associação estrutura-atividade.

Na segunda parte do trabalho os polissacarídeos da parede celular das leveduras *S. cerevisiae* e *C. albicans* foram analisados verificando-se diferenças nas proporções de açúcares presentes. Na parede celular da *S. cerevisiae* registou-se uma elevada proporção de glucose em ligação (1→4), até 70 %. Esta glucose será essencialmente glicogénio insolúvel cuja presença na parede da *S. cerevisiae* revela-se fundamental para a osmotolerância e manutenção da viabilidade celular. Em contraste a *C. albicans* apresenta teores reduzidos de glucose em ligação (1→4) em detrimento dos elevados teores de manoproteínas (1→2) e (1→2,6) bem como N-acetilglucosamina em ligação (1→4).

Sobre o tratamento enzimático da glucose em ligação (1→4) presente na *S. cerevisiae* e *C. albicans*, é possível concluir que o tratamento direto no AIR não se revela uma opção viável. Contudo parece que a glucose em ligação (1→4) estará em configuração α , não existindo nestas leveduras (1→4) glucose em configuração β .

Concluiu-se que a presença de modificação genética nas *C. albicans* analisadas não interfere com as proteínas da parede celular, nem com o perfil global de polissacarídeos e suas ligações glicosídicas. Assim, as alterações de fenótipo observadas para esta espécie não estão relacionadas com alterações diretas na composição da parede celular da levedura, mas possivelmente com detalhes de organização estrutural.

No geral, com a presente dissertação conclui-se que apesar de reportada uma estrutura básica, existem particularidades que diferenciam a parede celular das leveduras, incluindo leveduras do mesmo género. A diferença e a complexidade estrutural observada para a *S. pastorianus*, *S. cerevisiae* e *C. albicans* deixa em aberto possibilidades de estudo no ponto de vista bioquímico como também na valorização biotecnológica.

5. Trabalho Futuro

Perante o estudo realizado na presente dissertação em estudos futuros seria de interesse:

- ✓ Investigar a influência de fatores do processo fermentativo na modificação dos polissacarídeos da parede celular da *S. pastorianus*, tais como concentração de etanol, densidade do meio fermentativo, pH, temperatura, pressão osmótica e a própria reutilização da levedura. A compreensão da influência destes fatores na viabilidade/alteração da levedura poderá conduzir a otimizações no processo cervejeiro.
- ✓ Investigar uma metodologia que permita solubilizar as glucanas presentes no resíduo final da *S. pastorianus* possibilitando a sua aplicação biotecnológica. Para valorização da atividade biológica das β (1 \rightarrow 3), apesar de reportada atividade para glucanas particuladas, os efeitos adversos associados continuam a tornar preferível a utilização de glucanas solúveis.
- ✓ Perceber o tipo estrutura das glucanas com ligações α -(1 \rightarrow 4) e β -(1 \rightarrow 4) glucanas bem como o papel que desempenham na levedura. Para tal as glucanas em ligação (1 \rightarrow 4) devem ser purificadas, fracionadas e estudadas por RMN.
- ✓ Isolar as glucanas em ligação (1 \rightarrow 4) na *S. cerevisiae* e *C. albicans*, e comprovar se realmente não existem glucose em ligação β -(1 \rightarrow 4) nestas leveduras. Para o isolamento, poderá realizar-se uma extração alcalina das manoproteínas seguida de separação das β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6) glucanas por ação de uma β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6)-glucanase, respetivamente.
- ✓ Perceber que estrutura é responsável pela atividade imunoestimuladora observada, comprovando se as manoproteínas do RF apresentam atividade imunoestimuladora, como polímeros isolados ou em complexo com as glucanas.
- ✓ Investigar em detalhe a organização estrutural da parede celular da *C. albicans* para relacionar as alterações fenotípicas observadas com a alteração do seu código genético. Por exemplo, pode-se isolar manoproteínas cuja expressão envolve diretamente codões CUG (ex.: ALS -manoproteína envolvida na adesão celular) e

perceber se ocorre modificação na sua estrutura por incremento de Leu em detrimento da Ser. Também diferenças no perfil de fosforilação das manoproteínas da parede celular devem ser investigadas, por isolamento das manoproteínas e estudo por RMN.

6. Referências Bibliográficas

1. Feldmann H. **Yeast: molecular and cell biology**. John Wiley & Sons; 2010. 1-4.
2. Rosa C. A., Peter G. **Biodiversity and ecophysiology of yeasts**. Springer; 2005. 1-9.
3. Satyanarayana T., Kunze G. **Yeast biotechnology: diversity and applications**. Springer London; 2009. 3-18.
4. Petravic'-Tominac V. Z.-K., V.; Srećec, S.; Šantek, B.; Špoljaric', D.; Valpotic', H.; Popovic', M.; Valpotic', I. **Spent brewer's yeast - a raw material for isolation of β -glucan applicable in biotechnology and biomedicine**. Veterinarska Stanica. 2009;40:281-195.
5. Wang H., Xu Z., Gao L., Hao B. **A fungal phylogeny based on 82 complete genomes using the composition vector method**. BMC Evolutionary Biology. 2009;9(1):195.
6. Deerinck T. **Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) budding and with bud scars**. 2012 [15/01/2013]; Disponível em: http://www.allposters.co.uk/-sp/Yeast-Saccharomyces-Cerevisiae-Budding-and-with-Bud-Scars-SEM-X6000-Posters_i8995317_.htm.
7. Ostergaard S., Olsson L., Nielsen J. **Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae***. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2000;64(1):34-50.
8. Tamai Y., Momma T., Yoshimoto H., Kaneko Y. **Co-existence of two types of chromosome in the bottom fermenting yeast, *Saccharomyces pastorianus***. Yeast. 1998;14(10):923-33.
9. Piškur J., Smole S., Groth C., Petersen R. F., Pedersen M. B. **Structure and genetic stability of mitochondrial genomes vary among yeasts of the genus *Saccharomyces***. International Journal of Systematic Bacteriology. 1998;48(3):1015-24.
10. Dengis P. B., Nélisten L. R., Rouxhet P. G. **Mechanisms of yeast flocculation: comparison of top- and bottom-fermenting strains**. Applied and Environmental Microbiology. 1995;61(2):718-28.
11. Giolo M. P., Svidzinski T. I. E. **Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia**. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 2010;46:225-34.
12. White T. C. **Candida and candidiasis**. Mycopathologia. 2004;157(4):389-90.
13. Berman J., Sudbery P. ***Candida albicans*: A molecular revolution built on lessons from budding yeast**. Nature Reviews Genetics. 2002:918-32.
14. Sudbery P., Gow N., Berman J. **The distinct morphogenic states of *Candida albicans***. Trends in Microbiology. 2004;12(7):317-24.

15. Kunkel D. *Candida albicans*. 2009 [31/01/13]; Disponível em: http://www.ciriscience.org/ph_58-Candida_albicans_Copyright_Dennis_Kunkel_Microscopy.
16. Santos M. A. S., Tuite M. F. **The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans***. Nucleic Acids Research. 1995;23(9):1481-6.
17. Gomes A., Miranda I., Silva R., Moura G., Thomas B., Akoulitchiev A., Santos M. A. S. **A genetic code alteration generates a proteome of high diversity in the human pathogen *Candida albicans***. Genome Biology. 2007;8(10):1-15.
18. Miranda I., Rocha R., Santos M. C., Mateus D. D., Moura G. R., Carreto L., Santos M. A. S. **A Genetic code alteration is a phenotype diversity generator in the human pathogen *Candida albicans***. PLoS ONE. 2007;2(10):e996.
19. Latgé J. P. **The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell**. Molecular Microbiology. 2007;66(2):279-90.
20. Klis F. M., Boorsma A., De Groot P. W. **Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae***. Yeast. 2006;23(3):185-202. Epub 2006/02/25.
21. Lipke P. N., Ovalle R. **Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges**. Journal of Bacteriology. 1998;180(15):3735-40.
22. Gunja-Smith Z., Patil N. B., Smith E. E. **Two pools of glycogen in *Saccharomyces***. Journal of Bacteriology. 1977;130(2):818-25.
23. Perez-Garcia L. A., Diaz-Jimenez D. F., Lopez-Esparza A., Mora-Montes H. M. **Role of cell wall polysaccharides during recognition of *Candida albicans* by the innate immune system**. Glycobiology. 2011.
24. Stone B. **Callose and related glucans**. Encyclopedia of Life Sciences: John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
25. Klis F. M., Mol P., Hellingwerf K., Brul S. **Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae***. FEMS Microbiology Reviews. 2002;26(3):239-56.
26. Brown G. D., Gordon S. **Fungal β -glucans and mammalian immunity**. Immunity. 2003;19(3):311-5.
27. Lieberman M., Marks A. D. **Formation and degradation of glycogen**. Marks' basic medical biochemistry: A clinical approach 3ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2009. 518-35.
28. Kwiatkowski S., Thielen U., Glenney P., Moran C. **A study of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucans**. Journal of the Institute of Brewing. 2009;115(2):151-8.

29. Fleet G. H., Manners D. J. **Isolation and composition of an alkali-soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae***. Journal of General Microbiology. 1976;94(1):180-92.
30. Freimund S., Sauter M., Kappeli O., Dutler H. **A new non-degrading isolation process for 1,3-beta-D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae***. Carbohydrate Polymers. 2003;54(2):159-71.
31. Bishop C. T., Blank F., Gardner P. E. **The cell wall polysaccharides of *Candida albicans*: glucan, mannan, and chitin**. Canadian Journal of Chemistry. 1960;38(6):869-81.
32. Zeković D. B., Kwiatkowski S., Vrvić M. M., Jakovljević D., Moran C. A. **Natural and modified (1→3)-β-D-glucans in health promotion and disease alleviation**. Critical Reviews in Biotechnology. 2005;25(4):205-30.
33. Previato J. O., Gorin P., Haskins R. H., Travassos L. **Soluble and insoluble glucans from different cell types of the human pathogen *Sporothrix schenckii***. Experimental Mycology. 1979;3(1):92-105.
34. Cocuron J., Lerouxel O., Drakakaki G., Alonso A. P., Liepman A. H., Keegstra K., Raikhel N., Wilkerson C. G. **A gene from the cellulose synthase-like C family encodes a β-1,4 glucan synthase**. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007;104(20):8550-5.
35. Pinto M. M. **Caraterização dos polissacarídeos da levedura cervejeira excedentária** [Tese de Mestrado]: Universidade Aveiro; 2012.
36. Križková L., Ďuračková Z., Šandula J., Sasinková V., Krajčovič J. **Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans in vitro**. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2001;497(1–2):213-22.
37. Lesage G., Bussey H. **Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae***. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2006;70(2):317-43.
38. Corbacho I., Olivero I., Hernández L. M. **A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* nonessential genes involved in mannosyl phosphate transfer to mannoprotein-linked oligosaccharides**. Fungal Genetics and Biology. 2005;42(9):773-90.
39. Jigami Y., Odani T. **Mannosylphosphate transfer to yeast mannan**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 1999;1426(2):335-45.
40. Martínez-Esparza M., Sarazin A., Jouy N., Poulain D., Jouault T. **Comparative analysis of cell wall surface glycan expression in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts by flow cytometry**. Journal of Immunological Methods. 2006;314(1–2):90-102.
41. Ohno N. **Yeast and fungal polysaccharides**. Comprehensive Glycoscience. Oxford: Elsevier; 2007. 559-77.

42. Suzuki T., Ohno N., Chiba N., Miura N. N., Adachi Y., Yadomae T. **Immunopharmacological activity of the purified insoluble glucan, zymocel, in mice.** Journal of Pharmacy and Pharmacology. 1996;48(12):1243-8.
43. Petravić-Tominac V., Zechner-Krpan V., Grba S., Srećec S., Panjkota-Krbavčić I., Vidović L. **Biological effects of yeast β -glucans**2010.
44. Akramiene D., Kondrotas A., Didziapetriene J., Kevelaitis E. **Effects of beta-glucans on the immune system.** Medicina (Kaunas, Lithuania). 2007;43(8):597-606.
45. Ohno N., Uchiyama M., Tsuzuki A., Tokunaka K., Miura N., Adachi Y., Aizawa M. W., Tamura H., Tanaka S., Yadomae T. **Solubilization of yeast cell-wall β -(1 \rightarrow 3)-d-glucan by sodium hypochlorite oxidation and dimethyl sulfoxide extraction.** Carbohydrate Research. 1999;316(1-4):161-72.
46. Lee J. N., Lee D. Y., Ji I. H., Kim G. E., Kim H. N., Sohn J., Kim S., Kim C. W. **Purification of soluble beta-glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast.** Biosci Biotechnol Biochem. 2001;65(4):837-41.
47. Supphantharika M., Khunrae P., Thanardkit P., Verduyn C. **Preparation of spent brewer's yeast β -glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*.** Bioresource Technology. 2003;88(1):55-60.
48. Liu X., Wang Q., Cui S. W., Liu H. **A new isolation method of β -D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** Food Hydrocolloids. 2008;22(2):239-47.
49. Dallies N., François J., Paquet V. **A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.** Yeast. 1998;14(14):1297-306.
50. Hromádková Z., Ebringerová A., Sasinková V., Šandula J., Hříbalová V., Omelková J. **Influence of the drying method on the physical properties and immunomodulatory activity of the particulate (1 \rightarrow 3)- β -d-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*.** Carbohydrate Polymers. 2003;51(1):9-15.
51. Kwiatkowski S. **Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) glucan polysaccharides – occurrence, separation and application in food.** In: Industries F. a. H., editor. The complex world of polysaccharides2012. 47-70.
52. Kojima H., Akaki J., Nakajima S., Kamei K., Tamesada M. **Structural analysis of glycogen-like polysaccharides having macrophage-activating activity in extracts of *Lentinula edodes* mycelia.** Journal of Natural Medicines. 2010;64(1):16-23.
53. Raveendran P. K., Rodriguez S., Ramachandran R., Alamo A., Melnick S. J., Escalon E., Garcia Jr P., Wnuk S., Ramachandran C. **Immune stimulating properties of a novel polysaccharide from the medicinal plant *Tinospora cordifolia*.** International Immunopharmacology. 2004;4(13):1645-59.
54. Liu H., Wang Q., He Y. **Immunoactivities and antineoplastic activities of *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein.** Carbohydrate Polymers. 2011;83(4):1690-5.

55. Bohn J. A., BeMiller J. N. **(1→3)-β-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships.** Carbohydrate Polymers. 1995;28(1):3-14.
56. Mueller A., Raptis J., Rice P. J., Kalbfleisch J. H., Stout R. D., Ensley H. E., Browder W., Williams D. L. **The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1→3)-β-d-glucan receptors in a human monocyte-like cell line.** Glycobiology. 2000;10(4):339-46.
57. Williams D. L., McNamee R. B., Jones E. L., Pretus H. A., Ensley H. E., Browder I. W., Di Luzio N. R. **A method for the solubilization of a (1→3)-β-d-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*.** Carbohydrate Research. 1991;219(0):203-13.
58. Nono I., Ohno N., Masuda A., Oikawa S., Yadomae T. **Oxidative degradation of an antitumor (1-3)-beta-D-glucan, grifolan.** Journal of pharmacobio-dynamics. 1991;14(1):9-19.
59. Suda M., Ohno N., Hashimoto T., Koizumi K., Adachi Y., Yadomae T. **Kupffer cells play important roles in the metabolic degradation of a soluble anti-tumor (1 → 3)-β-D-glucan, SSG, in mice.** FEMS Immunology & Medical Microbiology. 1996;15(2-3):93-100.
60. Batbayar S., Lee D. H., Kim H. W. **Immunomodulation of fungal β-glucan in host defense signaling by dectin-1.** Biomolecules and Therapeutics. 2012;20(5):433-45.
61. Qi C., Cai Y., Gunn L., Ding C., Li B., Kloecker G., Qian K., Vasilakos J., Saijo S., Iwakura Y., Yannelli J. R., Yan J. **Differential pathways regulating innate and adaptive antitumor immune responses by particulate and soluble yeast-derived β-glucans.** Blood. 2011;117(25):6825-36.
62. Willment J. A., Gordon S., Brown G. D. **Characterization of the human β-glucan receptor and its alternatively spliced isoforms.** Journal of Biological Chemistry. 2001;276(47):43818-23.
63. Hong F., Yan J., Baran J. T., Allendorf D. J., Hansen R. D., Ostroff G. R., Xing P. X., Cheung N. V., Ross G. D. **Mechanism by which orally administered β-1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models.** The Journal of Immunology. 2004;173(2):797-806.
64. Rahar S., Swami G., Nagpal N., Nagpal M. A., Singh G. S. **Preparation, characterization, and biological properties of beta-glucans.** Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research. 2011;2(2):94-103. Epub 2011/12/16.
65. Tada H., Nemoto E., Shimauchi H., Watanabe T., Mikami T., Matsumoto T., Ohno N., Tamura H., Shibata K., Akashi S., Miyake K., Sugawara S., Takada H. ***Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner.** Microbiology and Immunology. 2002;46(7):503-12.

66. Oliveira M. C., Figueiredo-Lima D. F., Faria Filho D. E., Marques R. H., Moraes V. M. B. **Effect of mannanoligosaccharides and/or enzymes on antibody titers against infectious bursal and Newcastle disease viruses.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2009;61:6-11.
67. Darpossolo F., Eto S. F., Venancio E. J., Castro-Goméz R. I. J. H. ***Saccharomyces uvarum* mannoproteins stimulate a humoral immune response in mice.** Brazilian Archives of Biology and Technology. 2012;55:597-602.
68. Darpossolo F., Eto S. F., Venancio E. J., Castro-Goméz R. J. ***Saccharomyces uvarum* mannoproteins stimulate a humoral immune response in mice.** Brazilian Archives of Biology and Technology. 2012;55:597-602.
69. Young M., Davies M., Bailey D., Gradwell M., Smestad-Paulsen B., Wold J., Barnes R. R., Hounsell E. **Characterization of oligosaccharides from an antigenic mannan of *Saccharomyces cerevisiae*.** Glycoconjugate Journal. 1998;15(8):815-22.
70. Kogan G., Kocher A. **Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection.** Livestock Science. 2007;109(1):161-5.
71. Torrecillas S., Makol A., Caballero M. J., Montero D., Robaina L., Real F., Sweetman J., Tort L., Izquierdo M. S. **Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides.** Fish & Shellfish Immunology. 2007;23(5):969-81.
72. Chan G., Chan W., Sze D. **The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells.** Journal of Hematology & Oncology. 2009;2(1):25.
73. E. D., J. B. T., P. B. **Effect of PGG-glucan on the rate of serious postoperative infection or death observed after high-risk gastrointestinal operations.** Archives of Surgery. 1999;134(9):977-83.
74. Mason R. **What Is beta glucan?:** Safe Goods. New Century Publishing 2000; 2001.
75. Berdal M., Appelbom H. I., Eikrem J. H., Lund Å., Zykova S., Busund L., Seljelid R., Jenssen T. **Aminated β -1,3-D-glucan improves wound healing in diabetic db/db mice.** Wound Repair and Regeneration. 2007;15(6):825-32.
76. Lee S. B., Jeon H. W., Lee Y. W., Lee Y. M., Song K. W., Park M. H., Nam Y. S., Ahn H. C. **Bio-artificial skin composed of gelatin and (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)- β -glucan.** Biomaterials. 2003;24(14):2503-11.
77. Naumann E., Rees A. B., Önning G., Öste R., Wydra M., Mensink R. P. **β -Glucan incorporated into a fruit drink effectively lowers serum LDL-cholesterol concentrations.** The American Journal of Clinical Nutrition. 2006;83(3):601-5.
78. Torabizadeh H., Shojaosadati S. A., Tehrani H. A. **Preparation and characterisation of bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* and its application in food products.** LWT - Food Science and Technology. 1996;29(8):734-7.

79. Barriga J. A. T., Cooper D. G., Idziak E. S., Cameron D. R. **Components of the bioemulsifier from *S. cerevisiae***. Enzyme and Microbial Technology. 1999;25(1-2):96-102.
80. Cameron D. R., Cooper D. G., Neufeld R. J. **The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier**. Applied and Environmental Microbiology. 1988;54(6):1420-5.
81. Ferreira I., Pinho O., Vieira E., Tavares J. G. **Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications**. Trends in Food Science & Technology. 2010;21(2):77-84.
82. Ahmad A., Anjum F. M., Zahoor T., Nawaz H., Dilshad S. M. R. **Beta Glucan: A valuable functional ingredient in foods**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2011;52(3):201-12.
83. Thammakiti S., Suphantharika M., Phaesuswan T., Verduyn C. **Preparation of spent brewer's yeast β -glucans for potential applications in the food industry**. International Journal of Food Science & Technology. 2004;39(1):21-9.
84. Selvendran R. R., March J. F., Ring S. G. **Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber**. Analytical Biochemistry. 1979;96(2):282-92.
85. Coimbra M. A., Delgadillo I., Waldron K. W., Selvendran R. R. **Isolation and Analysis of Cell Wall Polymers from Olive Pulp**. In: Linskens H., Jackson J., editors. Plant Cell Wall Analysis: Springer Berlin Heidelberg; 1996. 19-44.
86. Ciucanu I., Kerek F. **A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates**. Carbohydrate Research. 1984;131(2):209-17.
87. Dikit P., Methacanon P., Visessanguan W., H-kittikun A., Maneerat S. **Characterization of an unexpected bioemulsifier from spent yeast obtained from Thai traditional liquor distillation**. International Journal of Biological Macromolecules. 2010;47(4):465-70.
88. Zumwalt R. W., Absheer J. S., Kaiser F. E., Gehrke C. W. **Acid hydrolysis of proteins for chromatographic analysis of amino acids**. Journal - Association of Official Analytical Chemists. 1987;70(1):147-51.
89. MacKenzie S. L., Tenaschuk D. **Gas-liquid chromatography of N-heptafluorobutyryl isobutyl esters of amino acids**. Journal of Chromatography A. 1974;97(1):19-24.
90. Ruiz-Herrera J., Leon C., Carabez-Trejo A., Reyes-Salinas E. **Structure and chemical composition of the cell walls from the haploid yeast and mycelial forms of *Ustilago maydis***. Fungal Genetics and Biology. 1996;20(2):133-42.
91. Lillie S. H., Pringle J. R. **Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation**. Journal of Bacteriology. 1980;143(3):1384-94.

92. Dake M. S., Khetmalas M. B., Amarapurkar S. V. **Role of insoluble glycogen in ethanol adaptation mechanism of *Saccharomyces italicus***. Indian Journal of Science and Technology. 2011;4:52-5.
93. Cao N., Xu Q., Ni J., Chen L. **Enzymatic hydrolysis of corn starch after extraction of corn oil with ethanol**. Applied Biochemistry and Biotechnology. 1996;57-58(1):39-47.
94. Bezerra A. R., Simoes J., Lee W., Rung J., Weil T., Gut I. G., Gut M., Bayes M., Rizzetto L., Cavalieri D., Giovannini G., Bozza S., Romani L., Kapushesky M., Moura G. R., Santos M. A. **Reversion of a fungal genetic code alteration links proteome instability with genomic and phenotypic diversification**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2013;17:17.